

00766.000043

PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

AKIHIRO UMEZAWA, ET AL.

Application No.: 09/749,728

Filed: December 28, 2000

For: THE CELL HAVING THE
POTENTIALITY OF
DIFFERENTIATION INTO
CARDIOMYOCYTES

Examiner: Ram R. Shukla

Group Art Unit: 1632

RECEIVED

AUG 08 2003

TECH CENTER 1600/2900

August 6, 2003

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

CLAIM TO PRIORITY

Sir:

Applicants hereby claim priority under the International Convention and all rights to which they are entitled under 35 U.S.C. § 119 based upon the following Japanese

Priority Applications:

No. 11-372826 filed December 28, 1999; and

No. PCT/JP00/01148 filed February 28, 2000.

Certified copies of the priority documents are enclosed.

Applicants' undersigned attorney may be reached in our New York office by telephone at (212) 218-2100. All correspondence should continue to be directed to our address given below.

Respectfully submitted,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Lawrence S. Perry", is written over a horizontal line.

Attorney for Applicants

Lawrence S. Perry

Registration No. 31,865

FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO
30 Rockefeller Plaza
New York, New York 10112-3801
Facsimile: (212) 218-2200

NY_MAIN 368009v1

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類は下記の出願書類の謄本に相違ないことを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2000年 2月28日

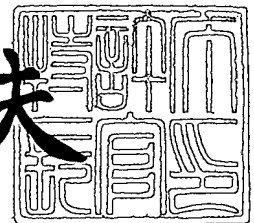
出 願 番 号
Application Number: PCT/JPO0/01148

出 願 人
Applicant (s): 協和醗酵工業株式会社
梅澤 明弘
/ 秦 順一
福田 恵一
小川 聡
桜田 一洋

2003年 7月 17日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証平 15-500198

特許協力条約に基づく国際出願

願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

国際出願番号	PCT/JP 00/01148
国際出願日	28.02.00
(受付印)	PCT International Application 日本国特許庁
出願人又は代理人の書類記号 (希望する場合、最大12字)	1217

第 I 欄 発明の名称	
心筋細胞への分化能を有する成体骨髄由来細胞	
第 II 欄 出願人	
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)	<input type="checkbox"/> この欄に記載した者は、 発明者でもある。 電話番号: 03-3282-0036 ファクシミリ番号: 03-3282-1527 加入電話番号:
協和醸酵工業株式会社 KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. 〒100-8185 日本国東京都千代田区大手町一丁目6番1号 6-1, Ohtemachi 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185 Japan	
国籍 (国名): 日本国 JP	住所 (国名): 日本国 JP
この欄に記載した者は、次の 指定国についての出願人である: <input type="checkbox"/> すべての指定国 <input checked="" type="checkbox"/> 米国を除くすべての指定国 <input type="checkbox"/> 米国のみ <input type="checkbox"/> 追記欄に記載した指定国	
第 III 欄 その他の出願人又は発明者	
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)	<input type="checkbox"/> この欄に記載した者は 次に該当する: <input type="checkbox"/> 出願人のみである。 <input checked="" type="checkbox"/> 出願人及び発明者である。 <input type="checkbox"/> 発明者のみである。 (ここにレ印を付したとき は、以下に記入しないこと)
梅澤 明弘 UMEZAWA Akihiro 〒270-0014 日本国千葉県松戸市小金 316 316, Kogane, Matsudo-shi, Chiba 270-0014 Japan	
国籍 (国名): 日本国 JP	住所 (国名): 日本国 JP
この欄に記載した者は、次の 指定国についての出願人である: <input type="checkbox"/> すべての指定国 <input type="checkbox"/> 米国を除くすべての指定国 <input checked="" type="checkbox"/> 米国のみ <input type="checkbox"/> 追記欄に記載した指定国	
<input checked="" type="checkbox"/> その他の出願人又は発明者が続集に記載されている。	
第 IV 欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名	
次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する: <input type="checkbox"/> 代理人 <input type="checkbox"/> 共通の代表者	
氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)	電話番号: ファクシミリ番号: 加入電話番号:
<input type="checkbox"/> 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す。	

第 III 欄の続き その他の出願人又は発明者

この欄を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

秦 順一 HATA Jun-ichi

〒141-0031 日本国東京都品川区西五反田 2-13-10

2-13-10, Nishigotanda, Shinagawa-ku, Tokyo 141-0031 Japan

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 JP

住所 (国名): 日本国 JP

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

福田 恵一 FUKUDA Keiichi

〒176-0006 日本国東京都練馬区栄町 3-2

3-2, Sakae-cho, Nerima-ku, Tokyo 176-0006 Japan

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 JP

住所 (国名): 日本国 JP

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

小川 聡 OGAWA Satoshi

〒157-0066 日本国東京都世田谷区成城 5-12-15

5-12-15, Seijo, Setagaya-ku, Tokyo 157-0066 Japan

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 JP

住所 (国名): 日本国 JP

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

桜田 一洋 SAKURADA Kazuhiro

〒194-8533 日本国東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号

協和醸酵工業株式会社 東京研究所内

c/o Tokyo Research Laboratories

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

6-6, Asahi-machi 3-chome, Machida-shi, Tokyo

194-8533 Japan

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 JP

住所 (国名): 日本国 JP

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国☐ その他の出願人又は発明者が他の続葉に記載されている。

第V欄 国の指定

4.9(a)の規定に基づき次の指定を行う（該当する□にレ印を付すこと； 少なくとも1つの□にレ印を付すこと）。

地域中特許

- ☒ **AP** **ARIPO** 中特許 : **GH** ガーナ Ghana, **GM** ガンビア Gambia, **KE** ケニア Kenya, **LS** レソト Lesotho, **MW** マラウイ Malawi, **SD** スーダン Sudan, **SL** シエラ・レオネ Sierra Leone, **SZ** スワジランド Swaziland, **UG** ウガンダ Uganda, **ZW** ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締結国である他の国
- ☒ **EA** **ユーラシア** 中特許 : **AM** アルメニア Armenia, **AZ** アゼルバイジャン Azerbaijan, **BY** ベラルーシ Belarus, **KG** キルギス Kyrgyzstan, **KZ** カザフスタン Kazakhstan, **MD** モルドヴァ Republic of Moldova, **RU** ロシア Russian Federation, **TJ** タジキスタン Tajikistan, **TM** トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締結国である他の国
- ☒ **EP** **ヨーロッパ** 中特許 : **AT** オーストリア Austria, **BE** ベルギー Belgium, **CH and LI** スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, **CY** キプロス Cyprus, **DE** ドイツ Germany, **DK** デンマーク Denmark, **ES** スペイン Spain, **FI** フィンランド Finland, **FR** フランス France, **GB** 英国 United Kingdom, **GR** ギリシャ Greece, **IE** アイルランド Ireland, **IT** イタリア Italy, **LU** ルクセンブルグ Luxembourg, **MC** モナコ Monaco, **NL** オランダ Netherlands, **PT** ポルトガル Portugal, **SE** スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締結国である他の国
- ☒ **OA** **OAPI** 中特許 : **BF** ブルキナ・ファソ Burkina Faso, **BJ** ベナン Benin, **CF** 中央アフリカ Central African Republic, **CG** コンゴ Congo, **CI** コートジボワール Côte d'Ivoire, **CM** カメルーン Cameroon, **GA** ガボン Gabon, **GN** ギニア Guinea, **GW** ギニア・ビサウ Guinea-Bissau, **ML** マリ Mali, **MR** モーリタニア Mauritania, **NE** ニジェール Niger, **SN** セネガル Senegal, **TD** チャード Chad, **TG** トーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権機構のメンバー国と特許協力条約の締結国である他の国（他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する）

国内中特許（他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する）

- | | |
|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE アラブ首長国連邦 United Arab Emirates | <input checked="" type="checkbox"/> LR リベリア Liberia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL アルバニア Albania | <input checked="" type="checkbox"/> LS レソト Lesotho |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM アルメニア Armenia | <input checked="" type="checkbox"/> LT リトアニア Lithuania |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT オーストリア Austria | <input checked="" type="checkbox"/> LU ルクセンブルグ Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU オーストラリア Australia | <input checked="" type="checkbox"/> LV ラトヴィア Latvia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ アゼルバイジャン Azerbaijan | <input checked="" type="checkbox"/> MD モルドヴァ Republic of Moldova |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia und Herzegovina | <input checked="" type="checkbox"/> MG マダガスカル Madagascar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB バルバドス Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG ブルガリア Bulgaria | <input checked="" type="checkbox"/> MN モンゴル Mongolia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR ブラジル Brazil | <input checked="" type="checkbox"/> MW マラウイ Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY ベラルーシ Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> MX メキシコ Mexico |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA カナダ Canada | <input checked="" type="checkbox"/> NO ノールウェー Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> NZ ニュー・ジーランド New Zealand |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN 中国 China | <input checked="" type="checkbox"/> PL ポーランド Poland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU キューバ Cuba | <input checked="" type="checkbox"/> PT ポルトガル Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ チェコ Czech Republic | <input checked="" type="checkbox"/> RO ルーマニア Romania |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE ドイツ Germany | <input checked="" type="checkbox"/> RU ロシア Russian Federation |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK デンマーク Denmark | <input checked="" type="checkbox"/> SD スーダン Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE エストニア Estonia | <input checked="" type="checkbox"/> SE スウェーデン Sweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES スペイン Spain | <input checked="" type="checkbox"/> SG シンガポール Singapore |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI フィンランド Finland | <input checked="" type="checkbox"/> SI スロヴェニア Slovenia |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB 英国 United Kingdom | <input checked="" type="checkbox"/> SK スロヴァキア Slovakia |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD グレナダ Grenada | <input checked="" type="checkbox"/> SL シエラ・レオネ Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE グルジア Georgia | <input checked="" type="checkbox"/> TJ タジキスタン Tajikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH ガーナ Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TM トルクメニスタン Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM ガンビア Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> TR トルコ Turkey |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR クロアチア Croatia | <input checked="" type="checkbox"/> TT トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU ハンガリー Hungary | <input checked="" type="checkbox"/> UA ウクライナ Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID インドネシア Indonesia | <input checked="" type="checkbox"/> UG ウガンダ Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL イスラエル Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US 米国 United States of America |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN インド India | <input checked="" type="checkbox"/> UZ ウズベキスタン Uzbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS アイスランド Iceland | <input checked="" type="checkbox"/> VN ヴィエトナム Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP 日本 Japan | <input checked="" type="checkbox"/> YU ユーゴスラヴィア Yugoslavia |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE ケニア Kenya | <input checked="" type="checkbox"/> ZA 南アフリカ共和国 South Africa |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG キルギス Kyrgyzstan | <input checked="" type="checkbox"/> ZW ジンバブエ Zimbabwe |
| <input type="checkbox"/> KP 北朝鮮 Democratic People's Republic of Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR 韓国 Republic of Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ カザフスタン Kazakhstan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC セント・ルシア Saint Lucia | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK スリ・ランカ Sri Lanka | |

下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締結国となった国を指定するためのものである

- | | |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> CR コスタリカ Costa Rica | <input checked="" type="checkbox"/> MA モロッコ Morocco |
| <input checked="" type="checkbox"/> DM ドミニカ Dominica | |
| <input checked="" type="checkbox"/> TZ タンザニア Tanzania | |

指定の確證の宣言：出願人は、上記の指定に加えて、規則 4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、この宣言から除く旨の表示を追記欄にした国は、指定から除かれる。出願人は、これらの追加される指定が確證を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確證がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。（指定の確證は、指定を特定する通知の提出と指定手数料及び確證手数料の納付からなる。この確證は、優先日から15月以内に受理官庁へ提出しなければならない。）

第VI欄 優先権主張

☐ 他の優先権の主張（先の出願）が追記欄に記載されている

先の出願日 (日、月、年)	先の出願番号	先の出願		
		国内出願：国名	広域出願：*広域官庁名	国際出願：受理官庁名
(1) 28.12.99	平成11年特許願 第372826号	日本国 JP		
(2)				
(3)				

☒ 上記()の番号の先の出願（ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限る）のうち、次の()の番号のものについては、出願書類の認証書を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁（日本国特許庁の長官）に対して請求している。

(1)

*先の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない（規則4.10(b)(ii)）。追記欄を参照。

第VII欄 国際調査機関

国際調査機関（ISA）の選択

先の調査結果の有用性請求：当該調査の照会（先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合）

出願日（日、月、年）

出願番号

国名（又は広域官庁）

ISA / JP

第VIII欄 照会欄：出願の言語

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。

願書 4 枚
 明細書（配列表を除く） 45 枚
 請求の範囲 7 枚
 要約書 1 枚
 図面 0 枚
 明細書の配列表 98 枚
 合計 155 枚

この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

1. ☒ 手数料計算用紙
☒ 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面
☐ 国際事務局の口座への振込みを証明する書面
2. ☐ 別個の記名押印された委任状
3. ☐ 包括委任状の写し
4. ☐ 記名押印（署名）の説明書
5. ☐ 優先権書類（上記第VI欄の()の番号を記載する）
6. ☐ 国際出願の翻訳文（翻訳に使用した言語名を記載する）
7. ☒ 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面
8. ☒ スクレオチド又はアミノ酸配列表（フレキシブルディスク）
9. ☒ その他（書類名を詳細に記載する）
 陳述書、フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面

要約書とともに提示する図面：

本国際出願の使用言語名： 日本語

第IX欄 提出者の記名押印

各人の氏名（名称）を記載し、その次に押印する。

協和醸酵工業株式会社



秦 順一



小川 聡



梅澤 明弘



福田 恵一



桜田 一洋



1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日

受理官庁記入欄

28.02.00

3. 国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であって

その後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）

4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日

5. 出願人により特定された
国際調査機関

ISA / JP

6. ☐ 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に
調査用写しを送付していない

2. 図面

☐ 受理された☐ 不足図面がある

国際事務局記入欄

記録原本の受理の日

出願人又は代理人の書類記号 1 2 1 7	国際出願番号
--------------------------	--------

寄託された微生物に関する表示
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。 1 3 頁、1 0 行	
B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）	
寄託の日付 2 2 . 0 2 . 0 0	受託番号 F E R M B P - 7 0 4 3
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/>	
ヨーロッパ特許が求められているそれぞれの指定国については、寄託微生物の標本の分譲は欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許出願が拒絶され、取下げられ若しくは取下げられたとみなされる日まで標本の請求人により指名された専門家に分譲することによってのみ可能である（Rule 28 (4) EPC）。	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）	
E. 追加事項の表示の提出（該当しない場合には記載しない） 下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

— 受理官庁記入欄 —
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 山 口 義 雄

— 国際事務局記入欄 —
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日
権限のある職員

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される。

原寄託についての受託証

氏名 (名称)

協和醗酵工業株式会社

取締役社長 平田 正

寄託者

あ て 名

東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) BMSC	(受託番号) FERM BP- 7043
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 ■ 科学的性質 ■ 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 12 年 2 月 22 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日 に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 National Institute of Advanced Industrial Science and Technology 名称: Agency for Industrial Science and Technology 所 長 大 箸 信 一 Dr. Shinichi Ohashi Director-General あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305-8566) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN 平成 12 年 (2000) 2 月 22 日	

明 細 書

心筋細胞への分化能を有する成体骨髄由来細胞

技術分野

本発明は、心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞の単離、精製、培養、分化誘導法に関する。また本発明は、各種サイトカイン、転写因子などを用いた、心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞の増殖方法および心筋細胞への分化を制御する方法に関する。本発明はさらに、心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞に特異的な表面抗原の取得方法、該表面抗原をコードする遺伝子の取得方法、該表面抗原特異的な抗体の取得方法、心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞の増殖および心筋細胞への分化に関与する蛋白質および遺伝子の取得方法に関する。本発明はまた、心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞を用いた各種心臓疾患の治療薬に関する。

背景技術

心筋細胞は、出生前は自律拍動しながら活発に細胞分裂を行っている。しかし、出生と同時にその分裂能は喪失し、肝細胞のように再び細胞分裂能を獲得することはない。また骨格筋細胞とも異なり衛星細胞といった未分化な前駆細胞を持つこともない。従って、心筋梗塞、心筋炎または老化等に伴い心筋細胞が壊死すると、生体内では残存心筋細胞の細胞分裂ではなく細胞の肥大がおきる。心肥大は初期においては生理的適応であるが、また共存する心線維芽細胞の増殖による間質の線維化と相まって心臓自体の拡張機能の低下、さらには収縮機能の低下へと結びつき心不全を呈するようになる。心筋梗塞等による心不全のこれまでの治療は心収縮力の増強、血管拡張薬による心臓の圧負荷・容量負荷の軽減、利尿薬による血流量の減少等の対症療法を中心に行われてきた。これに対し、心臓移植は重症心不全に対する根本的な治療法であるが、臓器提供者の不足、脳死判定の難しさ、拒絶反応、医療費の高騰等の問題から心臓移植が一般的な医療に普及するのは簡単ではない。実際、心臓病は我が国の死亡原因の第3位となっており（厚生白書平成10年）、失われた心筋細胞を再生することができれば医療福祉の大きな前進につながると考えられる。

現在までに、心筋細胞の性質を保存した細胞株としては、心房性ナトリウム利尿ホ

ルモンのプロモーターに SV40 の large T 抗原を組み換えて作製したトランスジェニックマウスの心房に生じた腫瘍から株化された AT-1 細胞があげられる[Science, 239; 1029-1038 (1988)]。しかしながら、該細胞は in vivo に移植すると腫瘍を形成するため、細胞移植には適さないという問題がある。そこで、このような背景のもと、心筋を再構築するため以下の方法が考えられた。

1 つ目の方法は、心筋細胞以外の細胞を心筋細胞に変換する方法である。これは、線維芽細胞に MyoD を導入すると骨格筋細胞に変換できることから類推された。これまでに、マウスの胎児性癌細胞である P 1 9 細胞での成功例は示されているものの[Cell Struc. & Func., 21: 101-110 (1996)]、非ガン細胞での成功例は報告されていない。

2 つ目の方法は、心筋細胞に再び分裂能を付与する方法である。これは、胎児期に心筋が拍動しながら分裂できる現象に基づいている。しかしながら、これまでに成功例は報告されていない。

3 つ目の方法は、未分化な幹細胞から心筋細胞を誘導する方法である。すでに、胚性幹細胞 (ES 細胞) から心筋細胞を誘導できることが示されているが、胚性幹細胞自身を成体に移植するとカルシノーマを形成すること、抗原性などの問題が存在する[Nature Biotechnology, 17, 139-142 (1999)]。

従って、胚性幹細胞を現実の医療へと応用するためには、少なくとも心筋前駆細胞あるいは、心筋細胞を純粋に精製する技術が不可欠である。抗原性の問題はクローン化の技術により解決できる可能性は示唆されているが、煩雑な操作を必要とすることから一般的な医療への応用は容易ではない。

中絶胎児から未分化な細胞である心筋前駆細胞を取得して移植に用いる方法も考えられており、動物を用いた実験では心筋細胞として有効に機能することが知られている[Science, 264, 98-101 (1994)]。しかしながら、この方法で大量の心筋前駆細胞を取得することは困難であり、倫理の観点からも一般的な医療への応用は容易ではない。

成体骨髄には造血系幹細胞および血管幹細胞以外に間葉系幹細胞が存在し、間葉系幹細胞からは骨細胞、軟骨細胞、腱細胞、靱帯細胞、骨格筋細胞、脂肪細胞、ストローマ細胞、肝臓 oval 細胞が分化誘導できることが報告されている[Science, 284, 143-147 (1999); Science, 284, 1168-1170 (1999)]。一方、最近、マウス成体の骨髄から取得

した細胞から、心筋細胞が分化誘導できることが見い出された[J. Clinical Investigation, 103, 10-18 (1999)]。該報告は患者自身から骨髓液を取得して、in vitro で細胞培養および薬剤処理を行った後に、心臓の障害部位へ移植する細胞治療が現実的な医療として可能になることを示唆している[J. Clinical Investigation, 103, 591-592 (1999)]。しかしながら、該報告は、成体マウスの骨髓から樹立した不死化細胞の一部が心筋細胞に分化できることを示したものにすぎない。また、成体骨髓中の心筋細胞に分化する能力を有する細胞の特性の同定、該細胞を増殖する方法、該細胞から効率的に心筋細胞に分化誘導する方法については明らかでなかった[J. Clinical Investigation, 103, 591-592 (1999)]。

発明の開示

現在の心疾患治療より安全かつ確実な治療が望まれている。そこで、骨髓細胞中より心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を選別し、心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞の増殖または分化をコントロールすることは、骨髓由来の細胞を用いた心筋の再生治療の開発に有用である。そのために、骨髓中の細胞から心筋細胞への分化能を有する細胞を特定して、該細胞の増殖または分化に働くサイトカインまたは転写因子を同定することが必要である。

本発明者は上記問題点を開発すべく鋭意研究し、以下の結果を得た。すなわち、マウス骨髓由来の細胞株を、GFP(Green Fluorescent Protein)を発現するレトロウイルスベクターを用いて標識し、1つの細胞を蛍光顕微鏡下で追跡することで、心筋細胞への分化能を有する細胞が、心筋細胞および脂肪細胞の少なくとも2種類の異なる細胞を分化誘導できる多分化能(Purulipotent)を持った幹細胞であることを見い出した。また、同時に増殖性を有し、心筋細胞だけに分化する心筋幹細胞、および有限の細胞分裂能を有し、心筋細胞だけに分化する心筋前駆細胞が存在することも見い出した。さらに、該幹細胞は通常の培養条件下ではすでに報告されている5-アザシチジンだけでなく、DMSO (dimethyl sulfoxide) などの他のゲノムDNAの脱メチル化剤の投与によっても、確率的 (stochastic) に心筋細胞、脂肪細胞および骨格筋細胞の系列に分化することを見出し、ゲノムDNAの脱メチル化が骨髓由来の細胞からの心筋細胞への

分化誘導に有効であることを明らかにした。また確率的 (stochastic) な分化が、培養条件やサイトカインの投与、転写因子の強制発現などにより心筋細胞、脂肪細胞および骨格筋細胞への分化の効率を改変できることを見い出した。すなわち、血小板由来増殖因子(PDGF)等のサイトカインあるいは all-trans レチノイン酸の投与、またはフィブロネクチンでコートした培養皿で培養することにより、心筋細胞形成の割合を増加させることを見い出した。また、線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2)の投与により、心筋細胞への分化を抑制できることも見い出した。

すなわち、本発明は以下の (1) ~ (96) を提供するものである。

- (1) 骨髄から単離され、心筋細胞に分化する能力を有する細胞。
- (2) 少なくとも心筋細胞と脂肪細胞に分化する能力を有する多分化能幹細胞である上記 (1) 記載の細胞。
- (3) 心筋細胞のみに分化誘導される心筋幹細胞である上記 (1) 記載の細胞。
- (4) 心筋細胞のみに分化誘導される心筋前駆細胞である上記 (1) 記載の細胞。
- (5) 心室筋細胞に分化する能力を有する、上記 (1) 記載の細胞。
- (6) 洞結節細胞に分化する能力を有する、上記 (1) 記載の細胞。
- (7) 骨髄がほ乳動物由来のものである、上記 (1) 記載の細胞。
- (8) ほ乳動物がヒト、ラットおよびマウスから選ばれるものである、上記 (7) 記載の細胞。
- (9) 細胞が、マウス骨髄由来幹細胞 BMSC (FERM BP-7043) である、上記 (1) 記載の細胞。
- (10) 染色体 DNA の脱メチル化により心筋細胞に分化する能力を有する、上記 (1) 記載の細胞。
- (11) 染色体 DNA の脱メチル化が、デメチラーゼ、5-アザシチジンおよびジメチルスルフォキシド (DMSO) からなる群から選ばれる少なくとも1種によるものであることを特徴とする、上記 (10) 記載の細胞。
- (12) デメチラーゼが、配列番号1記載で表されるアミノ酸配列を有するデメチラーゼである、上記 (11) 記載の細胞。
- (13) 胎児の心臓発生領域で発現している因子により心筋細胞の分化が促進され

る上記（１）記載の細胞。

（１４） 胎児の心臓発生領域で発現している因子がサイトカイン、接着分子、ビタミンおよび転写因子からなる群から選ばれる少なくとも１種であることを特徴とする、上記（１３）記載の細胞。

（１５） 胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子により心筋細胞への分化が促進される、上記（１）記載の細胞。

（１６） 胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子がサイトカイン、接着分子、ビタミンおよび転写因子からなる群から選ばれる少なくとも１種であることを特徴とする、上記（１５）記載の細胞。

（１７） サイトカインが血小板由来増殖因子（PDGF）である、上記（１４）または（１６）記載の細胞。

（１８） PDGF が配列番号３または５で表されるアミノ酸配列を有する PDGF である、上記（１７）記載の細胞。

（１９） 接着分子がフィブロネクチンである、上記（１４）または（１６）記載の細胞。

（２０） ビタミンがレチノイン酸である、上記（１４）または（１６）記載の細胞。

（２１） 転写因子が、Nkx2.5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2B、MEF-2C、MEF-2D、dHAND、eHAND、TEF-1、TEF-3 および TEF-5 からなる群から選ばれるものである、上記（１４）または（１６）記載の細胞。

（２２） Nkx2.5/Csx が配列番号９で表されるアミノ酸配列を有する Nkx2.5/Csx である、上記（２１）記載の細胞。

（２３） GATA4 が配列番号１１で表されるアミノ酸配列を有する GATA4 である、上記（２１）記載の細胞。

（２４） MEF-2A が配列番号１３で表されるアミノ酸配列を有する MEF-2A である、上記（２１）記載の細胞。

（２５） MEF-2B が配列番号１５で表されるアミノ酸配列を有する MEF-2B である、上記（２１）記載の細胞。

（２６） MEF-2C が配列番号１７で表されるアミノ酸配列を有する MEF-2C である、

上記(21)記載の細胞。

(27) MEF-2D が配列番号19で表されるアミノ酸配列を有する MEF-2D である、
上記(21)記載の細胞。

(28) dHAND が配列番号21で表されるアミノ酸配列を有する dHAND である、
上記(21)記載の細胞。

(29) eHAND が配列番号23で表されるアミノ酸配列を有する eHAND である、
上記(21)記載の細胞。

(30) TEF-1 が配列番号25で表されるアミノ酸配列を有する TEF-1 である、
上記(21)記載の細胞。

(31) TEF-3 が配列番号27で表されるアミノ酸配列を有する TEF-3 である、
上記(21)記載の細胞。

(32) TEF-5 が配列番号29で表されるアミノ酸配列を有する TEF-5 である、
上記(21)記載の細胞。

(33) 線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2) により心筋細胞への分化が抑制される、
上記(1)記載の細胞。

(34) FGF-2 が配列番号7または8記載のアミノ酸配列を有する FGF-2 である、
上記(33)記載の細胞。

(35) 染色体 DNA の脱メチル化剤を用いて、骨髓由来の細胞から心筋を形成する
方法。

(36) 染色体 DNA の脱メチル化剤が、デメチラーゼ、5-アザシチジンおよび
DMSO からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする、上記(35)
記載の方法。

(37) デメチラーゼが、配列番号1記載のアミノ酸配列で表されるデメチラーゼ
である、上記(36)記載の方法。

(38) 胎児の心臓発生領域で発現している因子を用いることを特徴とする、骨髓
由来の細胞から心筋を形成する方法。

(39) 胎児の心臓発生領域で発現している因子がサイトカイン、接着分子、ビタ
ミンおよび転写因子からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とす

る、上記(38)記載の方法。

(40) 胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子を用いることを特徴とする、骨髓由来の細胞から心筋を形成する方法。

(41) 胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子がサイトカイン、接着分子、ビタミンおよび転写因子からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする、上記(40)記載の方法。

(42) サイトカインが、PDGFである、上記(39)または(41)記載の方法。

(43) PDGFが配列番号3または5記載のアミノ酸配列で表されるPDGFである、上記(42)記載の方法。

(44) 接着分子がフィブロネクチンである、上記(39)または(41)記載の方法。

(45) ビタミンがレチノイン酸である、上記(39)または(41)記載の方法。

(46) 転写因子が、Nkx2.5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2B、MEF-2C、MEF-2D、dHAND、eHAND、TEF-1、TEF-3 および TEF-5 からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴する、上記(39)または(41)記載の方法。

(47) Nkx2.5/Csx が、配列番号9で表されるアミノ酸配列を有する Nkx2.5/Csx である、上記(46)記載の方法。

(48) GATA4 が、配列番号11で表されるアミノ酸配列を有する GATA4 である、上記(46)記載の方法。

(49) MEF-2A が、配列番号13で表されるアミノ酸配列を有する MEF-2A である、上記(46)記載の方法。

(50) MEF-2B が、配列番号15で表されるアミノ酸配列を有する MEF-2B である、上記(46)記載の方法。

(51) MEF-2C が、配列番号17で表されるアミノ酸配列を有する MEF-2C である、上記(46)記載の方法。

(52) MEF-2D が、配列番号19で表されるアミノ酸配列を有する MEF-2D である、上記(46)記載の方法。

(53) dHAND が、配列番号21で表されるアミノ酸配列を有する dHAND である、

上記（４６）記載の方法。

（５４） eHAND が、配列番号 23 で表されるアミノ酸配列を有する eHAND である、上記（４６）記載の方法。

（５５） TEF-1 が、配列番号 25 で表されるアミノ酸配列を有する TEF-1 である、上記（４６）記載の方法。

（５６） TEF-3 が、配列番号 27 で表されるアミノ酸配列を有する TEF-3 である、上記（４６）記載の方法。

（５７） TEF-5 が、配列番号 29 で表されるアミノ酸配列を有する TEF-5 である、上記（４６）記載の方法。

（５８） 染色体 DNA の脱メチル化剤を有効成分として含有することを特徴とする心筋形成剤。

（５９） 染色体 DNA の脱メチル化剤が、デメチラーゼ、5-アザシチジンおよび DMSO からなる群から選ばれる少なくとも 1 種である、上記（５８）記載の心筋形成剤。

（６０） デメチラーゼが、配列番号 1 記載のアミノ酸配列で表されるデメチラーゼである、上記（５９）記載の心筋形成剤。

（６１） 胎児の心臓発生領域で発現している因子を有効成分として含有する心筋形成剤。

（６２） 胎児の心臓発生領域で発現している因子がサイトカイン、接着分子、ビタミンおよび転写因子からなる群から選ばれる少なくとも 1 種であることを特徴とする、上記（６１）記載の心筋形成剤。

（６３） 胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子を有効成分として含有することを特徴とする心筋形成剤。

（６４） 胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子が、サイトカイン、接着分子、ビタミンおよび転写因子からなる群から選ばれる少なくとも 1 種であることを特徴とする、上記（６３）記載の心筋形成剤。

（６５） サイトカインが、PDGF である、上記（６２）または（６４）記載の心筋形成剤。

(66) PDGF が配列番号 3 または 5 記載のアミノ酸配列で表される、上記 (65) 記載の心筋形成剤。

(67) 接着分子がフィブロネクチンである、上記 (62) または (64) 記載の心筋形成剤。

(68) ビタミンがレチノイン酸である、上記 (62) または (64) 記載の心筋形成剤。

(69) 転写因子が、Nkx2.5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2B、MEF-2C、MEF-2D、dHAND、eHAND、TEF-1、TEF-3 および TEF-5 からなる群から選ばれる、上記 (62) または (64) 記載の心筋形成剤。

(70) Nkx2.5/Csx が、配列番号 9 記載のアミノ酸配列で表される Nkx2.5/Csx である、上記 (69) 記載の心筋形成剤。

(71) GATA4 が、配列番号 11 記載のアミノ酸配列で表される GATA4 である、上記 (69) 記載の心筋形成剤。

(72) MEF-2A が、配列番号 13 記載のアミノ酸配列で表される MEF-2A である、上記 (69) 記載の心筋形成剤。

(73) MEF-2B が、配列番号 15 記載のアミノ酸配列で表される MEF-2B である、上記 (69) 記載の心筋形成剤。

(74) MEF-2C が、配列番号 17 記載のアミノ酸配列で表される MEF-2C である、上記 (69) 記載の心筋形成剤。

(75) MEF-2D が、配列番号 19 記載のアミノ酸配列で表される MEF-2D である、上記 (69) 記載の心筋形成剤。

(76) dHAND が、配列番号 21 記載のアミノ酸配列で表される dHAND である、上記 (69) 記載の心筋形成剤。

(77) eHAND が、配列番号 23 記載のアミノ酸配列で表される eHAND である、上記 (69) 記載の心筋形成剤。

(78) TEF-1 が、配列番号 25 記載のアミノ酸配列で表される TEF-1 である、上記 (69) 記載の心筋形成剤。

(79) TEF-3 が、配列番号 27 記載のアミノ酸配列で表される TEF-3 である、

上記（６９）記載の心筋形成剤。

（８０） TEF-5 が、配列番号 29 記載のアミノ酸配列で表される TEF-5 である、
上記（６９）記載の心筋形成剤。

（８１） 上記（１）～（３４）のいずれか１項に記載の細胞を用いることを特徴とする、心臓疾患により破壊された心臓を再生する方法。

（８２） 上記（１）～（３４）のいずれか１項に記載の細胞を有効成分とする心臓再生治療薬。

（８３） 心臓の先天性遺伝子疾患での変異遺伝子に対する野生型遺伝子が導入された上記（１）～（３４）のいずれか１項に記載の細胞を用いることを特徴とする、先天性遺伝子疾患での変異遺伝子に対する野生型遺伝子を心筋へ特異的に輸送する方法。

（８４） 心臓の先天性遺伝子疾患での変異遺伝子に対する野生型遺伝子が導入された上記（１）～（３４）のいずれか１項に記載の細胞を有効成分として含有する心臓疾患治療薬。

（８５） 上記（１）～（３４）のいずれか１項に記載の細胞を免疫原として用いることを特徴とする、該細胞を特異的に認識する抗体を取得する方法。

（８６） 上記（８５）記載の方法で取得された抗体を用いることを特徴とする、ヒト骨髄から心筋細胞への分化能を有する成体骨髄由来細胞を単離・精製する方法。

（８７） 上記（１）～（３４）のいずれか１項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞に特異的な表面抗原を取得する方法。

（８８） 上記（１）～（３４）のいずれか１項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞を増殖する因子をスクリーニングする方法。

（８９） 上記（１）～（３４）のいずれか１項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞の心筋細胞への分化を誘導する因子をスクリーニングする方法。

（９０） 上記（１）～（３４）のいずれか１項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞を不死化する因子をスクリーニングする方法。

（９１） 上記（１）～（３４）のいずれか１項に記載の細胞にテロメラーゼを発現させることを特徴とする、該細胞の不死化方法。

(92) テロメラーゼが、配列番号31記載で表されるアミノ酸配列を有するテロメラーゼである上記(91)記載の方法。

(93) テロメラーゼを発現させることにより、不死化させた上記(1)～(34)のいずれか1項に記載の細胞を有効成分として含有する心臓疾患治療薬。

(94) テロメラーゼが、配列番号31記載で表されるアミノ酸配列を有するテロメラーゼである上記(93)記載の心臓疾患治療薬。

(95) 上記(1)～(34)のいずれか1項に記載の細胞を含んだ培養上清。

(96) 上記(95)記載の培養上清を用いることを特徴とする、上記(1)記載の細胞を心筋細胞に分化誘導する方法。

本発明の心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞とは、成体骨髄から単離された多分化能幹細胞、心筋幹細胞および心筋前駆細胞をいう。

多分化能幹細胞とは、心筋細胞および脂肪細胞の少なくとも2種類の異なる細胞を分化誘導できる細胞である。心筋幹細胞とは、増殖性を有し、心筋細胞だけに分化する能力を有する細胞である。心筋幹細胞に分化を誘導すると、心筋細胞および心筋幹細胞の2種類の細胞が形成される。心筋前駆細胞とは、有限の細胞分裂能を有し、心筋細胞だけに分化する能力を有する細胞である。心筋前駆細胞に分化を誘導すると心筋幹細胞とは異なり心筋細胞のみを形成する。

以下に、ヒト、ラット、マウスなどのほ乳類の成体骨髄から心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞を単離する方法を説明する。

1. 心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞の単離

ヒトの骨髄より心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞を取得する方法としては、安全かつ効率的に取得される方法であれば特に限定されないが、S. E. Haynesworth et al. Bone, 13, 81 (1992)に記載された方法に基づき行うことができる。

胸骨または腸骨から骨髄穿刺を行う。骨髄穿刺を行う場所の皮膚面を消毒し、局所麻酔を行う。特に骨膜下を十分に麻酔する。骨髄穿刺針の内筒を抜き、5000unitsのヘパリンを入れた10ml注射器を装着して必要量の骨髄液を速やかに吸引する。平均的には10ml～20mlの骨髄液を吸引する。骨髄穿刺針を取り外し、10分間程圧迫止血す

る。取得した骨髓液を $1,000 \times g$ の遠心分離により骨髓細胞を回収した後、該骨髓細胞を PBS (Phosphate Buffered Saline) で洗浄する。本ステップを 2 回繰り返した後、該骨髓細胞を 10% の FBS (牛胎仔血清) を含む α -MEM (α -modified MEM)、DMEM (Dulbecco's modified MEM) あるいは IMDM (Isocove's modified Dulbecco's medium) 等の細胞培養用培地に再浮遊させることにより骨髓細胞液を得ることができる。

該骨髓細胞液から心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を単離する方法としては、溶液中に混在する他の細胞、例えば血球系細胞、造血幹細胞、血管幹細胞および線維芽細胞などを除去できれば特に限定されないが、M. F. Pittenger et al. Science, 284, 143 (1999) に記載された方法に基づき骨髓細胞液を密度 1.073 g/ml の percoll に重層した後、 $1,100 \times g$ で 30 分間遠心分離して界面の細胞を回収することにより単離することができる。また、該骨髓細胞液に $10 \times \text{PBS}$ を加えて 9/10 に希釈した percoll を同容量加えて混合した後に、 $20,000 \times g$ で 30 分間遠心分離し、密度 $1.075 \sim 1.060$ の画分を回収することにより、該心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を含む骨髓細胞混合物を取得することができる。

上記方法により取得した該心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を含む骨髓細胞混合物は、96 穴の培養プレートの各穴に 1 細胞のみが注入されるように希釈して、1 細胞由来のクローンを多数調製した後、以下に記載した心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞から心筋細胞を誘導する方法を用いて該クローンを処理し、自律拍動する細胞が出現するクローンを選択することにより、該心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を得ることができる。多分化能幹細胞、心筋幹細胞および心筋前駆細胞は、後述する GFP (Green Fluorescent Protein) などのレポーター遺伝子を用いたシングルセル・マーキング (single cell marking) を行うことにより選別することができる。

ラットやマウスから心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を取得する方法としては、特に限定されないが以下の手順で取得することができる。ラットあるいはマウスを頸椎脱臼により致死させ、70% エタノールで充分消毒した後、大腿骨の皮膚ならびに大腿四頭筋を切除する。膝関節の部分にハサミをいれて関節をはずし、大腿骨背面の筋肉を除去する。股関節の部分にハサミを入れて関節を外し、大腿骨を取り出す。大腿骨に付着している筋肉をハサミでできるだけ除去した後、大腿骨の両端をハサミ

で切断する。骨の太さに応じた適当なサイズの針を 2.5ml の注射器に装着し、10%の FBS (牛胎仔血清) を含む α -MEM、DMEM、あるいは IMDM 等の細胞培養用培地約 1.5ml を注射器に充填した後、注射針の先端を大腿骨の膝関節側の断端に差し込む。注射器内の培養液を骨髓内に注入することで、股関節側の断端から骨髓細胞が押し出される。得られた骨髓細胞はピペッティングにより培養液中に浮遊させる。該骨髓液からは、上記のヒト骨髓液からの骨髓細胞の単離と同様の方法により、心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を単離することができる。以上の方法により単離した細胞の例としては、マウス骨髓由来幹細胞があげられる。マウス骨髓由来幹細胞 BMSC は、平成 12 年 2 月 22 日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号) に FERM BP-7043 として寄託されている。

2. 心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞の培養

上記 1 の方法により単離した、心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を培養するために用いる培地としては、通常公知 (組織培養の技術基礎編 第三版、朝倉書店 1996) の組成の細胞培養用培地を用いることができるが、好ましくは牛等の血清を 5~20% 添加した、 α -MEM、DMEM あるいは IMDM 等の細胞培養用培地などが用いられる。培養条件は、細胞が培養可能であればいかなる条件でもよいが、培養温度は 33~37°C が好ましく、さらに 5~10% の二酸化炭素ガスで満たした孵卵器で培養することが好ましい。心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞は、通常の組織培養用のプラスチック製培養皿に接着して増殖することが好ましい。細胞が培養皿一面に増殖する頃、培地を除去して、トリプシン EDTA 溶液を加えることで細胞を浮遊させる。浮遊した細胞は、PBS あるいは該細胞培養用の培地で洗浄後、該細胞培養用の培地で 5 倍から 20 倍希釈して新しい培養皿に添加することで、さらに継代培養することができる。

3. 心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞からの心筋細胞の誘導

心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞より心筋細胞を誘導する方法としては、(1) DNA の脱メチル化剤処理による分化誘導、(2) 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子による分化誘導、(3) 心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞または該骨髓細胞から分化した心筋細胞の培養上清による分化誘導などの方法を挙げることができる。これらの方法を単

独あるいは組み合わせることにより、心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞から心筋細胞を誘導することができる。

DNA の脱メチル化剤としては、DNA に対して脱メチル化を引き起こす化合物であればいかなるものでもよい。DNA の脱メチル化剤としては、染色体 DNA 中の GpC 配列中のシトシン残基のメチル化を特異的に阻害する酵素であるデメチラーゼ、5-アザシチジン（以下 5-aza-C と略す）、DMSO (dimethyl sulfoxide) などがあげられる。デメチラーゼとしては、配列番号 1 記載のアミノ酸配列を有するデメチラーゼ[Nature, 397, 579-583 (1999)]などがあげられる。DNA の脱メチル化剤処理による分化誘導の具体例を以下に示す。

3mmol/l から 10mmol/l の間の濃度になるように 5-aza-C を心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を含む培地中に添加し、24 時間上記培養条件下でインキュベーションする。培地を交換することで 5-aza-C を除去し、さらに 2～3 週間培養することで心筋細胞を取得することができる。形成される心筋細胞は培養 2～3 週間目では洞結節細胞が中心であるが、培養 4 週間目以降心室型心筋細胞を分化誘導することができる。

胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子としては、サイトカイン、ビタミン、接着分子、転写因子などをあげることができる。

サイトカインとしては、心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞に、心臓の発生段階で心筋細胞への分化を促進するものであればいかなるサイトカインでもよい。

具体的には、10～40ng/ml の血小板由来増殖因子（以下、PDGF と略記する。）、などをあげることができる。PDGF としては、配列番号 3 または 5 のアミノ酸配列で表されるものが好ましく用いられる。

また、心筋細胞への分化を抑制するサイトカインに対する阻害剤を用いることにより、心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞に、心臓の発生段階で心筋細胞への分化を促進することも可能である。

心筋細胞への分化を抑制するサイトカインとしては、線維芽細胞増殖因子-2（以下、FGF-2 と略記する。）、具体的には、配列番号 7 または 8 で表される FGF-2 などをあげることができる。

心筋細胞への分化を抑制するサイトカインに対する阻害剤としては、サイトカインの情報伝達を阻害する物質、例えばサイトカインを中和する抗体、低分子化合物などをあげることができる。

ビタミンとしては、レチノイン酸など心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞に、心臓の発生段階で心筋細胞への分化を促進するものであればいかなるビタミンでもよい。具体的には、 10^{-9} M のレチノイン酸などをあげることができる。

接着分子としては、フィブロネクチンなど心臓の発生段階で心臓発生領域で発現していればいかなる接着分子でもよい。具体的には、フィブロネクチンをコートした培養皿で該心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞を培養することにより心筋細胞への分化を促進することができる。

転写因子としては、ホメオボックス型転写因子 Nkx2.5/Csx (配列番号 9 : アミノ酸配列、配列番号 10 : 塩基配列)、GATA ファミリーに属する Zinc finger 型転写因子 GATA4 (配列番号 11 : アミノ酸配列、配列番号 12 : 塩基配列)、myocyte enhancer factor-2(MEF-2)ファミリーに属する転写因子 MEF-2A (配列番号 13 : アミノ酸配列、配列番号 14 : 塩基配列)、MEF-2B (配列番号 15 : アミノ酸配列、配列番号 16 : 塩基配列)、MEF-2C (配列番号 17 : アミノ酸配列、配列番号 18 : 塩基配列) と MEF-2D (配列番号 19 : アミノ酸配列、配列番号 20 : 塩基配列)、basic helix loop helix 型転写因子に属する dHAND (配列番号 21 : アミノ酸配列、配列番号 22 : 塩基配列) と eHAND (配列番号 23 : アミノ酸配列、配列番号 24 : 塩基配列)、TEA-DNA 結合型転写因子ファミリーに属する TEF-1 (配列番号 25 : アミノ酸配列、配列番号 26 : 塩基配列)、TEF-3 (配列番号 27 : アミノ酸配列、配列番号 28 : 塩基配列) と TEF-5 (配列番号 29 : アミノ酸配列、配列番号 30 : 塩基配列)などをあげることができる。

上述した転写因子は、該因子をコードする DNA を心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞中に導入し、DNA を発現させることにより心筋細胞への分化を誘導させることができる。また、該因子を心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞培養液中に添加することによっても、心筋細胞へ分化誘導させることができる。

自律拍動する心筋細胞の培養上清を心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞培養液中に添加することで心筋細胞への分化を誘導させることができる。

また、以下に示す方法で得られる心筋細胞への分化を誘導する因子（以下、心筋分化誘導因子と称する）を用いても、心筋細胞への分化能を有する骨髓由来細胞を心筋細胞に分化誘導することができる。

4. 心筋分化誘導因子の取得

心筋分化誘導因子の取得方法としては、自律拍動する細胞の培養上清に各種プロテアーゼ阻害剤を添加して、透析、塩析ならびにクロマトグラフィーなどを組み合わせることにより取得することができる。

さらにマイクロシーケンサーを用いて、上記の心筋分化誘導因子の部分アミノ酸配列を決定し、該アミノ酸配列に基づき設計した DNA プローブを用いて該自律拍動する細胞より作製した cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、心筋分化誘導因子の遺伝子を取得することができる。

5. 心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を含む心臓再生治療薬または心臓疾患治療薬

本発明の心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞は、心臓再生または心臓疾患の治療薬として用いることができる。

心臓疾患としては、心筋梗塞、虚血性心疾患、うっ血性心不全、不整脈、肥大型心筋症、拡張型心筋症、心筋炎、弁膜症などをあげることができる。

心臓再生の治療薬としては、心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を高純度で含み、心臓の障害部位ならび大きさに応じて、該心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を増殖させたもの、好ましくは、心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞から、心筋内皮細胞(Endocardial endothelial cell)、クッション細胞(Cushion cell)、心室型心筋細胞、心房型心筋細胞、洞結節細胞等の心臓を形成する様々な細胞へ分化誘導できる細胞が用いられる。

該治療薬は、心筋梗塞の患者骨髓液中から上述した密度勾配遠心分離法、後述する心筋細胞への分化能を有する細胞を特異的に認識する抗体を用いたパニング法[J.

Immunol., 141(8), 2797-2800 (1988)]あるいは FACS 法[Int. Immunol., 10(3), 275-283

(1998)]、または心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞に特異的な遺伝子のプロモーターを用いたレポーター系を構築する方法により該心筋細胞への分化能を有する骨髓

細胞の精製を行うことにより、製造することができる。

また該治療薬には、後述する心筋形成剤を用いて、該心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を心筋細胞へ分化誘導させた細胞、高齢者の骨髓から取得した骨髓細胞より、後述する不死化方法を利用して細胞分裂能を賦活させた心筋細胞への分化能を有する細胞も含まれる。

上記方法で製造した治療薬は、上記心筋細胞への分化能を有する細胞を特異的に認識する抗体と FACS 法を組み合わせることで純度を検定することができる。

上記の治療薬を障害部位に輸送する方法としては、カテーテルを利用する方法等が用いられる。以下虚血性心疾患を例に具体的な方法を示す。虚血性心疾患で障害を受けた心筋細胞は、血管狭窄部位の下流に存在することから、上記の細胞を注入する前に、冠動脈造影法（図説病態内科講座 循環器—1、MEDICAL VIEW,1993）により血管の狭窄部位を同定しておく必要がある。器質的狭窄病変は狭窄病態に応じて求心性狭窄、偏心性狭窄、多発性壁不整に分類され、特に偏心性狭窄はタイプⅠおよびタイプⅡの2つのタイプに細分類される。狭窄形態は狭心症の経過、予後に関連することが知られており、タイプⅡの偏心性狭窄や多発性壁不整は不安定狭心症例に多く、心筋梗塞に移行する可能性が高い。血管が完全に狭窄している場合には、注入する細胞が障害部位に到達しない可能性があるので、事前に経皮的冠動脈形成術(PTCA)あるいは血栓溶解療法などにより狭窄部位を再開することが必要である。障害を受けた心筋細胞の部位に応じて、注入する細胞を心室型や心房型のように区別することができる。カテーテルの挿入法は右上腕動脈より挿入する Sones 法（図説病態内科講座 循環器—1、MEDICAL VIEW,1993）あるいは大腿動脈より挿入する Jundkins 法（図説病態内科講座 循環器—1、MEDICAL VIEW,1993）を利用することができる。

6. 心筋形成剤

本発明の心筋形成剤は、染色体 DNA の脱メチル化剤、胎児の心臓発生領域で発現している因子、あるいは胎児の心臓発生段階で心筋細胞への分化に働く因子のいずれかの心筋分化誘導因子の少なくとも一種類を有効成分として含有し、骨髓由来の細胞を心筋細胞へ分化誘導させることができる。

心筋分化誘導因子としては、サイトカイン、ビタミン、接着分子、転写因子などを

あげることができる。

サイトカインとしては、心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞に、心臓発生段階で心筋細胞への分化を促進するものであればいかなるサイトカインでもよい。

具体的には、10~40ng/mlのPDGFなどをあげることができる。PDGFとしては、配列番号3または5のアミノ酸配列で表されるものが好ましく用いられる。

ビタミンとしては、レチノイン酸など心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞に、心臓発生段階で心筋細胞への分化を促進するものであればいかなるビタミンでもよい。具体的には、 10^{-9} Mのレチノイン酸などをあげることができる。

接着分子としては、フィブロネクチンなど心臓発生段階で心臓発生領域で発現していればいかなる接着分子でもよい。具体的には、フィブロネクチンをコートした培養皿で該心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞を培養することにより心筋細胞への分化を促進することができる。

転写因子としては、ホメオボックス型転写因子 Nkx2.5/Csx (配列番号9: アミノ酸配列、配列番号10: 塩基配列)、GATAファミリーに属する Zinc finger 型転写因子 GATA4 (配列番号11: アミノ酸配列、配列番号12: 塩基配列)、myocyte enhancer factor-2(MEF-2)ファミリーに属する転写因子 MEF-2A (配列番号13: アミノ酸配列、配列番号14: 塩基配列)、MEF-2B (配列番号15: アミノ酸配列、配列番号16: 塩基配列)、MEF-2C (配列番号17: アミノ酸配列、配列番号18: 塩基配列)と MEF-2D (配列番号19: アミノ酸配列、配列番号20: 塩基配列)、basic helix loop helix 型転写因子に属する dHAND (配列番号21: アミノ酸配列、配列番号22: 塩基配列)と eHAND (配列番号23: アミノ酸配列、配列番号24: 塩基配列)、TEA-DNA 結合型転写因子ファミリーに属する TEF-1 (配列番号25: アミノ酸配列、配列番号26: 塩基配列)、TEF-3 (配列番号27: アミノ酸配列、配列番号28: 塩基配列)と TEF-5 (配列番号29: アミノ酸配列、配列番号30: 塩基配列)などをあげることができる。

該心筋形成剤には心筋分化誘導因子の遺伝子を主成分とするものと、心筋分化誘導因子の本体である蛋白質を含むものがある。

(1) 遺伝子を主成分とする心筋形成剤

以下に本発明の心筋形成剤が心筋分化誘導因子をコードする遺伝子を主成分とする

場合の調製法について述べる。

まず、心筋分化誘導因子の遺伝子 DNA 断片、あるいは全長 c DNA をウイルスベクタープラスミド内のプロモーターの下流に挿入することにより、組換えウイルスベクタープラスミドを造成する。

該組換えウイルスベクタープラスミドを、該ウイルスベクタープラスミドに適合したパッケージング細胞に導入する。

パッケージング細胞としては、ウイルスのパッケージングに必要なタンパク質をコードする遺伝子の少なくとも 1 つを欠損している組換えウイルスベクタープラスミドの該欠損する蛋白質を補給できる細胞であればいかなるものも用いることができる。例えばヒト腎臓由来の HEK293 細胞、マウス線維芽細胞 NIH3T3 などを用いることができる。

パッケージング細胞で補給する蛋白質としては、レトロウイルスベクターの場合はマウスレトロウイルス由来の gag、pol、env などの蛋白質、レンチウイルスベクターの場合は HIV ウイルス由来の gag、pol、env、vpr、vpu、vif、tat、rev、nef などの蛋白質、アデノウイルスベクターの場合はアデノウイルス由来の E1A、E1B などの蛋白質、アデノ随伴ウイルスの場合は Rep(p5,p19,p40)、Vp(Cap)などの蛋白質を用いることができる。

ウイルスベクタープラスミドとしては上記パッケージング細胞において組換えウイルスが生産でき、心臓先天性遺伝子疾患の原因遺伝子に対する野生型の遺伝子を心筋細胞で転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

ウイルスベクタープラスミドとしては MFG [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6733-6737 (1995)], pBabePuro [Nucleic Acids Research, 18, 3587-3596 (1990)], LL-CG、CL-CG、CS-CG、CLG [Journal of Virology, 72, 8150-8157 (1998)], pAdex1 [Nucleic Acids Res., 23, 3816-3821 (1995)]等が用いられる。

プロモーターとしては、ヒト組織中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (ヒト CMV) の IE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40 の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、SR α プロモーター

等をあげることができる。また、ヒト CMV の IE 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。また、Nkx2.5/Csx 遺伝子のような心筋細胞特異的な遺伝子のプロモーターを用いることで、心筋細胞で特異的に目的の遺伝子を発現させることができる。

上記組換えウイルスベクタープラスミドを上記パッケージング細胞に導入することで組換えウイルスベクターを生産することができる。上記パッケージング細胞への上記ウイルスベクタープラスミドの導入法としては、例えば、リン酸カルシウム法[特開平 2-227075]、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。

上述した組換えウイルスベクターは、遺伝子治療剤に用いる基剤と共に調合して心筋形成剤を製造することができる[Nature Genet., 8, 42 (1994)]。遺伝子治療剤に用いる基剤としては、通常注射剤に用いる基剤であればいかなるものでも用いることができる。例えば、蒸留水、塩化ナトリウム又は塩化ナトリウムと無機塩との混合物等の塩溶液、マンニトール、ラクトース、デキストラン、グルコース等の溶液、グリシン、アルギニン等のアミノ酸溶液、有機酸溶液又は塩溶液とグルコース溶液との混合溶液等があげられる。また常法に従い、これらの基剤に浸透圧調整剤、pH 調整剤、ゴマ油、ダイズ油等の植物油又はレシチンもしくは非イオン界面活性剤等の界面活性剤等の助剤を用いて、溶液、懸濁液、分散液として注射剤を調製してもよい。これらの注射剤を、粉末化、凍結乾燥等の操作により用時溶解用製剤として調製することもできる。上記の心筋形成剤は、液体の場合はそのまま、固体の場合は治療の直前に必要により滅菌処理をした上記の基剤に溶解して遺伝子治療に使用することができる。本発明の心筋形成剤の投与方法は、患者の治療部位の心筋に吸収されるように、カテーテル等を用いて局所的に投与方法等が用いられる。

上述した組換えウイルスベクターは試験管内で該心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞に感染させた後、上述した心筋形成剤として調製し、患者に投与することができる。または、組換えウイルスベクターを患者の患部に直接投与することもできる。

(2) 蛋白質を主成分とする心筋形成剤

以下に本発明の心筋形成剤が心筋分化誘導因子蛋白質を主成分とする場合の調製

法について述べる。

心筋分化誘導因子蛋白質の完全長 cDNA をもとに、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さの DNA 断片を調製する。

該 DNA 断片、あるいは完全長 cDNA を発現ベクター内のプロモーターの下流に挿入することにより、該蛋白質の組換え発現ベクターを造成する。

該組換え発現ベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞内に導入する。

宿主細胞としては、目的とする DNA を発現できるものは全て用いることができ、例えば、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、ミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属等に属する細菌、クルイベロミセス (*Kluyveromyces*) 属、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、シゾサッカロマイセス (*Shizosaccharomyces*) 属、トリコスポロン (*Trichosporon*) 属、シワニオミセス (*Schwanniomyces*) 属等に属する酵母や動物細胞、昆虫細胞等を用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込みが可能で、心筋分化誘導因子の遺伝子 DNA を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌を宿主細胞として用いる場合は、心筋分化誘導因子の組換え発現ベクターは該細菌中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、心筋細胞への分化を誘導できる蛋白質をコードする DNA および転写終結配列より構成された組換え発現ベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2 (いずれもベーリンガー・マンハイム社より市販)、pKK233-2 (Amersham Pharmacia Biotech 社製)、pSE280 (Invitrogen 社製)、pGEMEX-1 (Promega 社製)、pQE-8 (QIAGEN 社製)、pKYP10 [特開昭 58-110600]、pKYP200 [Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-) (Stratagene 社製)、pGEX (Amersham Pharmacia Biotech

社製)、pET-3 (Novagen 社製)、pTerm2(USP4686191、USP4939094、USP5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)] 等を例示することができる。

発現ベクターとしては、リボソーム結合配列であるシャインーダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば 6 ~ 18 塩基) に調節したものをを用いることが好ましい。

プロモーターとしては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trp プロモーター (P trp)、lac プロモーター (P lac)、P_L プロモーター、P_R プロモーター、T7 プロモーター等の大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1 プロモーター、SPO2 プロモーター、penP プロモーター等をあげることができる。また P trp を 2 つ直列させたプロモーター (P trp x 2)、tac プロモーター、letI プロモーター [Gene, 44, 29 (1986)]、lacT7 プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

本発明の心筋分化誘導因子の遺伝子 DNA の蛋白質をコードする部分の塩基配列を、宿主の発現に最適なコドンとなるように、塩基を置換することにより、目的とする蛋白質の生産率を向上させることができる。

本発明の心筋分化誘導因子の遺伝子 DNA の発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、ブレヴィバクテリウム属、シュードモナス属、バチルス属、ミクロバクテリウム属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas

sp. D-0110 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へ DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭 63-248394)、または Gene, 17, 107 (1982) や Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979) に記載の方法等をあげることができる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEpl3 (ATCC37115)、YEpl24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15 等を例示することができる。

プロモーターとしては、酵母中で発現できるものであればいかなるものでもよく、例えば、PHO5 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター、gal 1 プロモーター、gal 10 プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF α 1 プロモーター、CUP 1 プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クリュイペロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*)、トリコスポロン・プルランス (*Trichosporon pullulans*)、シュワニオミセス・アルビウス (*Schwanniomyces alluvius*) 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods in Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)] 等をあげることができる。

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1 (Invitrogen 社製)、pcDM8 (Invitrogen 社製)、pAGE107 [特開平 3-22979; Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAS3-3 (特開平 2-227075)、pCDM8 [Nature, 329, 840 (1987)]、pcDNA1/Amp (Invitrogen 社製)、pREP4 (Invitrogen 社製)、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pAGE210 等を例示することができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いること

ができ、例えば、サイトメガロウイルス（ヒト CMV）の IE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40 の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒト CMV の IE 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞である COS 細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞、HBT5637 [特開昭 63-299] 等をあげることができる。

組換えベクターの導入法としては、動物細胞に DNA を導入できるいかなる方法も用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、リポフェクション法 [Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 84, 7413 (1987)、Virology, 52, 456 (1973)] 等を用いることができる。形質転換体の取得および培養は、特開平 2-227075 号公報あるいは特開平 2-257891 号公報に記載されている方法に準じて行なうことができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル[Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York (1992)]、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サブルメント 1-38(1987-1997)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともに Invitrogen 社製) 等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperda の卵巣細胞である Sf9、Sf21 [Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H.Freeman and Company, New York, (1992)]、Trichoplusia ni の卵巣細胞である High 5 (Invitrogen 社製) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 [特開平 2-227075]、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング 第 2 版 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加された蛋白質を得ることができる。

心筋細胞への分化を誘導できる蛋白質をコードする DNA を組み込んだ組換え体 DNA を保有する形質転換体を培地に培養し、培養物中に心筋細胞への分化を誘導できる蛋白質を生成蓄積させ、該培養物より該蛋白質を採取することにより、心筋細胞への分化を誘導できる蛋白質を製造することができる。

心筋細胞への分化を誘導できる蛋白質製造用の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該宿主が資化し得る炭素源、窒素源、無機物等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

炭素源としては、それぞれの宿主が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモ

ニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等が用いられる。

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15~40°Cがよく、培養時間は、通常16時間~7日間である。培養中pHは、3.0~9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変MEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)]またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH6~8、30~40°C、5%CO₂存在下等の条件下で1~7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている TNM-FH 培地 (Pharmingen 社製)、Sf-900 II SFM 培地 (Life Technologies 社製)、ExCell400、ExCell405 (いずれも JRH Biosciences 社製)、Grace's Insect Medium [Grace, T.C.C., Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

培養は、通常 pH6~7、25~30°C等の条件下で、1~5 日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上述の形質転換体の培養物から、心筋細胞への分化を誘導できる蛋白質を単離精製するには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、心筋細胞への分化を誘導できる蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)ーセファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学社製) 等レジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(Amersham Pharmacia Biotech 社製)等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

また、該蛋白質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、細胞を回収後破碎し、遠心分離することにより、沈殿画分として蛋白質の不溶体を回収する。

回収した該蛋白質の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。

該可溶化液を、希釈あるいは透析により、該可溶化液中の蛋白質変性剤の濃度を下げることにより、該蛋白質の構造を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該蛋白質の精製標品を得る。

心筋細胞への分化を誘導できる蛋白質あるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清から、該蛋白質あるいはその糖鎖付加体等の誘導体

を回収することができる。即ち、培養物から遠心分離等の手法により培養上清を回収し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

このようにして取得される蛋白質として、例えば、配列番号 5、6、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28 および 30 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質等をあげることができる。

また、上記方法により発現させた蛋白質を、Fmoc 法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc 法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法によっても製造することができる。また、米国 Advanced ChemTech 社製、Perkin-Elmer 社製、Amersham Pharmacia Biotech 社製、米国 Protein Technology Instrument 社製、米国 Synthecell-Vega 社製、米国 PerSeptive 社製、島津製作所社製等のペプチド合成機を利用して合成することもできる。

心筋細胞への分化を誘導できる蛋白質は、上記(1)と同様にして心筋形成剤を形成し使用することができる。

7. 先天性遺伝子疾患の治療への利用

心不全を来す疾患の中には、一部であるが単一遺伝子の変異により、本来必要な蛋白質が全て欠損するために心不全を来す一群がある。このような疾患としては、家族性肥大型心筋症、Fabri 病、QT 延長症候群、マルファン症候群、大動脈弁狭窄症、ミトコンドリア心筋症、Duchenne 型筋ジストロフィー症等があげられる。これらの疾患は、ミオシン、トロポニン、トロポミオシン、電位依存性 Na チャンネル、K チャンネル、フィブリン、エラステイン、ミトコンドリア、ジストロフィンなどの遺伝子異常が原因であることが知られている [治療学, 30,1302-1306(1996)]。すなわち、これら患者より本発明の心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を取得し、正常な遺伝子を導入して心臓に移植することで上記疾患を治療することができる。正常な遺伝子は、上記 6 (1) で記載した遺伝子治療用のベクターを用いることで本発明の心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞に導入することができる。

8. 心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞特異的な表面抗原を特異的に認識する抗体の取得

以下に、本発明の心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞で発現している表面抗原を特異的に認識する抗体の調製法について述べる。

本発明の心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞で特異的に発現している表面抗原を認識する抗体は、心筋梗塞などの心臓病の細胞治療を実施する上で必要な心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞の純度検定や精製に用いることができる。

該抗体を取得する方法として、本発明の心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞 $3 \sim 5 \times 10^5$ cells/匹、あるいは該細胞から調製した細胞膜画分 1~10mg/匹程を抗原として、ウサギ、ヤギまたは 3~20 週令のラット、マウスもしくはハムスター等の非ヒトほ乳動物の皮下、静脈内または腹腔内に、適当なアジュバント[例えば、フロイドの完全アジュバント(Complete Freund's Adjuvant)または、水酸化アルミニウムゲル、百日咳菌ワクチンなど]とともに投与する。

該抗原の投与は、1 回目の投与の後 1~2 週間おきに 3~10 回行う。各投与後、3~7 日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応するか否かを酵素免疫測定法[酵素免疫測定法(ELISA 法)：医学書院刊 1976 年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]などで調べる。

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒトほ乳動物を、血清または抗体産生細胞の供給源とする。

ポリクローナル抗体は、該血清を分離、精製することにより調製することができる。

モノクローナル抗体は、該抗体産生細胞と非ヒトほ乳動物由来の骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマを培養するか、動物に投与して該動物を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより調製することができる。

抗体産生細胞としては、脾細胞、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞、特に脾細胞が好適に用いられる。

骨髓腫細胞としては、8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c 由来)骨髓腫細胞株である P3-X63Ag8-U1(P3-U1)株[Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1 (1978)]、P3-NS1/1-Ag41(NS-1)株[European J. Immunology, 6, 511 (1976)]、SP2/O-Ag14(SP-2)株[Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653)株[J. Immunology, 123,

1548 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63)株 [Nature, 256, 495 (1975)] 等、マウス由来の株化細胞が好適に用いられる。

ハイブリドーマ細胞は、以下の方法により作製できる。

抗体産生細胞と骨髓腫細胞を混合し、HAT培地（正常培地にヒポキサンチン、チミジンおよびアミノプテリンを加えた培地）に懸濁したのち、7～14日間培養する。培養後、培養上清の一部をとり酵素免疫測定法などにより、抗原に反応し、抗原を含まない蛋白質には反応しないものを選択する。ついで、限界希釈法によりクローニングを行い、酵素免疫測定法により安定して高い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞として選択する。

ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を分離、精製する方法としては、遠心分離、硫酸沈殿、カプリル酸沈殿、またはDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

上記方法で取得した、該心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞で発現している表面抗原を特異的に認識する抗体を用いて、検体細胞に対する反応性と造血系幹細胞、神経系幹細胞などの対照となる細胞に対する反応性とを比較することで、検体細胞が上記特異的 surface 抗原を発現しているかどうかを容易に検定することができる。

9. 心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞で発現している表面抗原および該表面抗原をコードする遺伝子の取得

該心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞で特異的に発現している表面抗原遺伝子の取得方法としては、二つの異なる由来のサンプル間で異なる発現形態を取る遺伝子を取得する方法であるサブトラクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5738-5742 (1988)]や Representational difference analysis[Nucleic Acids Research, 22, 5640-5648 (1994)]による方法をあげることができる。

まず、心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞より作製した cDNA ライブラリーを、造血系幹細胞や神経系幹細胞などの骨髓細胞以外の対照細胞より取得した mRNA を用いてサブトラクションを行う。心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞特異的な遺伝子を濃縮した差分化 cDNA ライブラリーを調製した後、該差分化 cDNA ライブラリー

の挿入 cDNA 配列を 5' 側よりランダムに塩基配列解析を行い、分泌シグナル配列を持つものだけを選択する。このようにして得られた cDNA の全長塩基配列を決定することにより、該 cDNA がコードする蛋白質が分泌蛋白質か膜蛋白質かを区別することができる。

上記の方法において、ランダム配列解析の代わりに、シグナルシーケンストラップ法も用いることもできる [Science, 261, 600-603 (1993); Nature Biotechnology, 17, 487-490 (1999)]。シグナルシーケンストラップ法とは、分泌シグナル配列をもつ遺伝子を選択的にスクリーニングする方法である。

効率よく特異的な表面抗原を取得するためには、シグナルシーケンストラップライブラリーをサブトラクションが行えるベクターを用いて作製し、心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞から作製したシグナルシーケンストラップライブラリーを造血系幹細胞や神経系幹細胞などの対照となる細胞より取得した mRNA を用いてサブトラクションを行う方法が望ましい。このようにして取得された分泌シグナル配列を含む DNA 断片は全長 cDNA をクローン化するためのプローブとして用いることができる。

全長 cDNA はその全長塩基配列を解析することで、該 cDNA がコードする蛋白質が分泌蛋白質か膜蛋白質かを区別することができる。

ランダム配列解析あるいはシグナルシーケンストラップ法を用いた場合でも、得られたクローンが膜蛋白質をコードする場合は、塩基配列から類推されるアミノ酸配列に基づき合成ペプチドを作製し、該合成ペプチドを抗原として上記方法により特異的な抗体を取得することができる。

また、膜蛋白質の場合は、受容体をコードしているものがあり、このような受容体は該心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞の特異的な増殖または心筋細胞への分化の調節に働いている可能性があり、当該受容体のリガンドの探索に用いることができる。分泌蛋白質の場合は、直接心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を増殖あるいは分化させるために用いることができる。

10. 心筋細胞への分化能のある骨髓細胞の増殖因子および心筋細胞への分化誘導因子のスクリーニング

心筋細胞への分化能のある骨髓細胞の増殖因子および心筋細胞への分化誘導因子

のスクリーニング方法としては、心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を無血清培地中で培養させる際に、検体である種々の物質を添加させ、該細胞が増殖するか、または心筋細胞へ分化誘導されるかで調べることにより行うことができる。

検体となる物質としては、各種サイトカインや増殖因子などの分泌蛋白質、細胞接着分子などの膜結合蛋白質、組織抽出液、合成ペプチド、合成化合物、微生物培養液等などいかなるものでもよい。

増殖能力はコロニー形成能や BrdU の取り込みなどで調べることができる。

コロニー形成能は、本発明の骨髓細胞を低密度で播種することにより調べることができる。

BrdU の取り込みは、BrdU を特異的に認識する抗体を用いた免疫染色により調べることができる。

心筋細胞への分化を評価する方法としては、自律拍動を指標にするかまたは筋細胞で特異的に発現する遺伝子のプロモーターと GFP(Green fluorescent protein) 、ルシフェラーゼ、ベクターガラクトシダーゼなどのレポーター遺伝子とを組み合わせたベクターDNA を該心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞に導入したレポーター細胞を用いてレポーター遺伝子の発現を指標にする方法があげられる。

レポーター系の構築には cardiac troponin I(cTNI)のプロモーターを用いる方法があげられる[J. Biological Chemistry, 273, 25371-25380 (1998)]。

1 1. 心筋細胞への分化能のある骨髓細胞の不老化

心臓疾患の患者、特に高齢者に本発明の治療薬を投与する場合、本発明の心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞をガン化させずに細胞分裂の回数を増やすことが望ましい。

骨髓細胞をガン化させずに細胞分裂の回数を増やす方法としては、テロメラーゼを本発明の心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞に発現させる方法をあげることができる。

例えば、テロメラーゼの触媒サブユニットである TERT 遺伝子、具体的には配列番号 32 で表される DNA を、レトロウイルスベクターに導入した後に心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞に導入する方法、または心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞に

内在する TERT 遺伝子を誘導発現させる因子を心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞に投与する方法、あるいは TERT 遺伝子を誘導発現させる因子をコードする DNA を含むベクターを心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞に導入する方法などをあげることができる。

このような TERT 遺伝子を誘導発現させる因子は、心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞に TERT 遺伝子プロモーターと GFP(Green Fluorescent protein)、ルシフェラーゼ、あるいはベクターガラクトシダーゼを組み合わせたレポーター系を心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞に導入することで選別することができる。

以下に実施例をあげて、本発明を具体的に示す。

発明を実施するための最良の形態

実施例 1. マウス骨髓からの心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞の取得と培養

5 週齢の C3H/He マウス 10 匹をエーテルを用いて麻酔し、そのうえで頸椎脱臼により致死させた。マウスを半側臥位にして、70%エタノールを充分かけ消毒した。

次に大腿骨周辺の皮膚を広い範囲にわたり切開し、大腿骨全面の大腿四頭筋をはさみで切除した。膝関節の部分に軽くはさみを入れ、関節を外し、さらに大腿骨背面の筋肉を切除した。股関節の部分にはさみを入れ関節を外し、大腿骨を取り出した。大腿骨に付着している筋肉をはさみで切除し、大腿骨全体を露出させた。大腿骨の両端をはさみで切断後、テルモ製 23G の針を装着した 2.5ml 注射器に 20%FCS を含有する IMDM 培地を約 1.5ml 入れ、注射針の先端を大腿骨の膝関節側の断端に差し込み、試験管の中に培養液を吹き出すことで、骨髓細胞を押し出した。取得した細胞は、20%FCS、100mg/ml penicillin、250ng/ml streptomycin、85mg/ml amphotericin を含有する IMDM 培地中で 33°C で、5% CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。継代を続けることで、細胞は間葉系の細胞へと均一化し、造血系の細胞は消失した。

約 4 ヶ月上記条件で培養を行い、不死化した細胞を選択した後、希釈により 192 種類の独立した単一細胞(single cell)由来の細胞株を樹立した（以下、骨髓由来初代不死化細胞株と称する）。これら独立のクローン由来の細胞にそれぞれに 3mM の終濃度になるように 5-aza-C を添加し 24 時間培養した後、培地を IMDM 培地に代えてさらに 2 週間培養することで拍動する細胞を産生するクローンを選択した。骨髓由来初代

不死化細胞 192 個のうち、心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞は 3 個であった。該心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞は、心筋細胞以外に脂肪細胞を分化誘導したことからいずれも多分化能幹細胞であることが示された。多分化能幹細胞から、非特異的に分化誘導してくる自己拍動細胞の割合は非常に少ない。

しかし、この自己拍動する細胞周辺をクローニングシリンジで採取し、培養した細胞（以下、単に心筋前駆細胞と称する）に、再び 5-aza-C を添加し 24 時間培養した後、培地を IMDM 培地に代えてさらに 2~3 週間培養することでより多くの自律拍動する細胞を取得した。該心筋細胞への分化能を有する骨髓幹細胞は、増殖条件下では、単核の線維芽細胞様の形態を呈し、心筋収縮蛋白質はほとんど発現していない。しかし 5-aza-C により最終分化を誘導すると形態は著しく変化した。

分化誘導 1 週間目頃より、一部の細胞は細胞質が大きくなり円形あるいは棒状を呈し、後に自律拍動を開始する細胞となるが、この時点では自律拍動を行うことは少なかった。分化誘導後 2 週間になると、自己拍動を開始した。この自己拍動した細胞は互いに連結しあい、縦に連結して筋管細胞様となった。3 週間以後には多くの細胞が縦に 1 列にならび、同期して収縮した。分化後 4 週間以後には培養皿の上の直接連結される細胞は、すべて同期して収縮し心筋組織様になった。マウスの心臓は、毎分 300~400 回程度の心拍数で収縮するが、これに対してマウス成体骨髓由来の細胞より分化した心筋細胞は、培養条件下において毎分 120~250 回の速さで規則的に収縮した。

実施例 2. マウス骨髓細胞から誘導される心筋細胞の特性

骨髓由来細胞から形成される自律拍動する心筋様細胞が、実際に心筋細胞の性質を保有しているかどうかの解析を行った。

実施例 1 で取得した、骨髓由来初代不死化細胞株、多分化能幹細胞および心筋前駆細胞から分化誘導した心筋細胞から、それぞれ Trizol Reagents (GIBCO BRL 社製) を用いて全 RNA を取得した。次に、該全 RNA を基質として SuperscriptII reverse transcriptase (GIBCO BRL 社製) を用いて First strand cDNA を合成した。

次に、心筋細胞特異的な遺伝子の発現を検討するために、該 First strand cDNA を基質として、配列番号 33~58 に示した塩基配列を有する合成 DNA を用いて定量的 PCR を行った。心筋細胞特異的な遺伝子としては、ナトリウム利尿ペプチドである ANP

およびBNP、ミオシン重鎖である α -MHC および β -MHC、アクチンである α -skeletal actin および β -skeletal actin、ミオシン軽鎖であるMLC-2a、MLC-2v、心筋細胞特異的転写因子であるNkx2.5/Csx、GATA4、TEF-1、MEF-2C、MEF-2D、MEF-2Aを用いた。

ANPの増幅には配列番号33、34の塩基配列を有する合成DNAを、BNPの増幅には配列番号35、36の塩基配列を有する合成DNAを、 α -MHCの増幅には配列番号37、38の塩基配列を有する合成DNAを、 β -MHCの増幅には配列番号39、40の塩基配列を有する合成DNAを、 α -skeletal actinの増幅には配列番号41、42の塩基配列を有する合成DNAを、 β -skeletal actinの増幅には配列番号43、44の塩基配列を有する合成DNAを、MLC-2aの増幅には配列番号45、46の塩基配列を有する合成DNAを、MLC-2vの増幅には配列番号47、48の塩基配列を有する合成DNAを、Nkx2.5/Csxの増幅には配列番号49、50の塩基配列を有する合成DNAを、GATA4の増幅には配列番号51、52の塩基配列を有する合成DNAを、TEF-1の増幅には配列番号53、54の塩基配列を有する合成DNAを、MEF-2Cの増幅には配列番号55、56の塩基配列を有する合成DNAを、MEF-2Dの増幅には配列番号57、58の塩基配列を有する合成DNAを、MEF-2Aの増幅には配列番号59、60の塩基配列を有する合成DNAを用いた。

生体内で分化誘導する心筋細胞は、心筋収縮の心拍数またはエネルギー効率に違いを持たせるために、胎児期、新生児期あるいは成熟期によって、または心房筋あるいは心室筋の相違によって、心筋収縮蛋白質のアイソフォームに違いがある。

培養系で心筋細胞に分化した骨髄細胞の場合、アイソフォームの発現様式は α -アクチンの場合は骨格筋型のほうが心筋型より多く発現し、ミオシン重鎖の場合は β 型のほうが α 型よりも多く発現していた。ミオシン軽鎖では2v型が発現しているのに対し、2a型の発現は観察されなかった。

また、培養系で心筋細胞に分化した骨髄細胞の分化誘導後には、ナトリウム利尿ペプチドであるANPおよびBNPの発現が見られた。以上の心筋収縮蛋白質の発現様式より判断すると、培養系で心筋細胞に分化した骨髄細胞の表現型は胎児型心室筋細胞の形質を有すると考えられる。

培養系で心筋細胞に分化した骨髄細胞では、Nkx2.5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2C、

MEF-2D、TEF-1 遺伝子の発現が観察された。増殖中の骨髓由来初代不死化細胞株ではこれらの転写因子の発現は認められなかったが、増殖中の骨髓由来心筋前駆細胞では Nkx2.5/Csx、GATA4 および MEF-2C の発現が観察され、心筋細胞への分化誘導に伴い、遅れて MEF-2A および MEF-2D の発現誘導が観察された。

次に、ガラス微小電極により、培養系で心筋細胞に分化した骨髓細胞の活動電位を記録した。活動電位は、細胞を 1.49mM CaCl_2 、4.23mM KCl、25mM HEPES(pH7.4)を添加した IMDM 培地中で培養し、Diaphoto-300 実体顕微鏡(ニコン社製)下、温度 25°C で測定した。ガラス電極は電極抵抗を 15~30 Ω に設定して 3M KCl を充填した。膜電位の測定は MEZ-8300 (日本光電社製) を用いて電流クランプモードで行った。測定結果は RTA-1100M (日本光電社製) を用いて熱感紙に記録した。その結果、培養系で心筋細胞に分化した骨髓細胞は、洞結節細胞型と心室筋細胞型の 2 種類が観察された。両者に共通する活動電位の特徴は、①活動電位持続時間が長いこと、②比較的浅い静止期電位を持つこと、③ペースメーカー細胞にみられる静止期電位の緩やかな脱分極が認められることであった。また、心室筋細胞型では活動電位は Peak&Dome 型(活動電位第 1 相を持つ)を呈した。洞結節細胞型の活動電位持続時間、拡張期膜電位、活動電位振幅は従来ウサギやラットで報告されている洞結節の活動電位と近似していた。心室筋細胞型ではこれに比べて、静止期膜電位は深く、活動電位振幅は大きい傾向を示した。分化誘導後、2~3 週間の細胞はすべて洞結節細胞型が記録されたが、分化誘導後 4 週間頃より心室筋細胞型が観察され時間経過とともに次第に増加した。

実施例 3. サイトカインを用いた心筋細胞への分化の促進

心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓細胞の心筋分化誘導率を増加させるため、5-aza-C で分化誘導をおこなう際に、各種サイトカインを添加して誘導率が増加するかどうか解析をおこなった。

心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓細胞を 2×10^4 細胞/ml となるように 60mm 培養ディッシュあるいは 60mm フィブロネクチン付着ディッシュ(fibronectin-coated dish:Becton Dickinson 社製)に蒔き、33°C、5% CO_2 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

翌日、該培養液に 5-aza-C を終濃度 3 μM となるよう添加した上で、更に、PDGF

のみ、PDGF とレチノイン酸の両方、添加なし、の 3 種類の群で培地中に添加した（終濃度は PDGF は 10ng/ml、レチノイン酸は 10^{-9} M）。

それから更に 2 日後、4 日後にも培地交換した後、PDGF のみ、PDGF とレチノイン酸の両方、添加なしの 3 群にそれぞれ最初と同量を添加した。

薬剤を加えてから 4 週間後、細胞の形態を位相差顕微鏡下で観察した。その結果、5-aza-C のみを添加した培養ディッシュでは約 3 割の細胞が筋管様細胞となるのに対し、PDGF を添加すると約 4 割、PDGF とレチノイン酸を同時に添加すると約 5 割の細胞が筋管様細胞となった。また、フィブロネクチン付着ディッシュの 3 群では、培養ディッシュの 3 群に比べて、筋管様細胞になる細胞数が約 1 割程度ずつ増加した。

実施例 4．DMSO を用いた骨髓由来幹細胞からの心筋細胞への分化誘導

実施例 1 に示した方法により、取得した心筋細胞への分化能のある骨髓幹細胞に 3 μ M の 5-aza-C の代わりに 10 μ M の DMSO を添加し 24 時間培養した後、培地を IMDM 培地に代えて、さらに 6 週間培養を続けた。

その結果、拍動する心筋細胞が分化誘導されることを見出し、これらの細胞には Nkx2.5/Csx および GATA4 遺伝子が発現しており、5-aza-C を添加したときと同様の性質を有した心筋細胞であることが示された。この解析結果は、5-aza-C と DMSO の共通の機能である染色体 DNA の脱メチル化が心筋細胞の分化に必要であることを示している。

実施例 5．心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓細胞が多分化能を有する幹細胞および心筋前駆細胞であることの証明

マウス骨髓細胞から分化誘導する拍動細胞が心筋細胞の性質を保有していることは示されたが、心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓細胞に、心筋前駆細胞が存在しているのか、もっと未分化で心筋細胞以外の、例えば脂肪細胞などに分化可能な幹細胞が存在するかを調べるため、シングルセル・マーキング (Single cell marking) の実験を行った。

具体的には、分化誘導を行う前に、ある 1 つの細胞に GFP 遺伝子をウィルスベクターを導入して標識し、その後分化誘導させて標識した細胞がどのような細胞に分化したかで判断した。

まず、GFP 遺伝子を発現させるレトロウイルスベクタープラスミド GAR3-GFP および、Ecotropic 遺伝子を発現させる pCMV-Eco プラスミドベクターを、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 等に記載のアルカリ中和法および PEG 沈殿法を用いて、純度の高い DNA を取得した。

この DNA をトランスフェクションさせる前日に、コンフルエントになった、gag および pol 遺伝子を保有する 293 細胞を 1/5 希釈で 10cm ディッシュに継代し、一晩 37°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養をおこなった。

トランスフェクションは以下の通りに行った。

GAR3-GFP レトロウイルスベクタープラスミド DNA 15 μ g と pCMV-Eco プラスミドベクター DNA 5 μ g を 250mM CaCl₂ (pH6.95) 0.5ml に加えて溶解させ、その溶液を 15ml のチューブに入れた 2×BBS [50mM BES(N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid)、280mM NaCl、1.5mM Na₂HPO₄(pH6.95)] 0.5ml に滴下して 10 分間室温で静置させた。その後、この DNA 溶液を、前日に用意した 293 細胞培地中に滴下させ、37°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。翌日、培地を交換し、更に 37°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

培地を交換して 2 日後に、培養上清を 0.45 μ m のフィルター (Millipore 社製) でろ過し、ウィルスベクターを含む溶液を回収した。この溶液を IMDM 培地で 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ に希釈した。

ウィルスベクターを導入される側の心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞は、ウィルスをインフェクションさせる前日に 2×10⁴ 細胞/ウェルとなるように 6 ウェル・ディッシュに蒔いた。

希釈した、ウィルスベクターを含む溶液には、終濃度 8 μ g/ml となるように、Hexadimethrine bromide(polybrene) (Sigma 社製) を添加し、心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞の培養上清 2ml をウィルス液 2ml と置換し、33°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養をおこなった。5 時間後、培養上清を新しい IMDM 培地に交換し、更に 33°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

2 日間培養を行った後、蛍光顕微鏡下で GFP を発現している細胞を観察し、細胞 1000 個あたり 1 つの GFP 陽性細胞があるような細胞群を得た。

該細胞を 8×10^3 細胞/ディッシュとなるよう、35mm ガラスベースディッシュ（旭テクノグラス社製）に蒔き、 33°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

翌日、5-aza-C（Sigma 社製）、PDGF-BB（Peprotech 社製）、all trans レチノイン酸（Sigma 社製）をそれぞれ終濃度 $3 \mu\text{M}$ 、 10ng/ml 、 10^{-9}M となるよう添加し、添加して2日後および4日後には、培地交換を行うとともに、再度 PDGF-BB（以降 PDGF と略す）、all trans レチノイン酸を上述と同じ濃度で添加した。

4週間後、蛍光顕微鏡で GFP 陽性細胞がどのように分化したかを観察すると、心筋細胞のみが GFP 陽性になっている細胞集団、心筋細胞と未分化幹細胞が GFP 陽性になっている細胞集団、ならびに心筋細胞、脂肪細胞および未分化幹細胞の3者が GFP 陽性になっている細胞集団の3種類の細胞集団が見られた。すなわち、多分化能幹細胞から心筋幹細胞さらに心筋前駆細胞へと確率的 (stochastic) に誘導してくることが明らかとなった。またこの結果は、心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓細胞には多分化能をもつ幹細胞が存在することを示している。

実施例 6．転写因子の強制発現による心筋細胞分化の促進

マウス心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞に心筋細胞分化に関係する転写因子を強制的に発現させることによる心筋細胞への分化に与える影響を解析した。

具体的には、分化誘導を行う前に、Nkx2.5/Csx または GATA4 遺伝子をウイルスベクターを用いて導入して、その後分化誘導させて心筋細胞への分化の効率を検討した。

まず、Nkx2.5/Csx と GATA4 の遺伝子を発現させる目的で、レトロウイルスベクタープラスミド pCLNCX (Imgenex 社) に Nkx2.5/Csx と GATA4 をそれぞれ組み込み、pCLNC-Nkx2.5/Csx と pCLNC-GATA4 を調製した。レトロウイルスベクタープラスミド pCLNC-Nkx2.5/Csx と pCLNC-GATA4 および、Ecotropic 遺伝子を発現させる pCMV-Eco プラスミドベクター (Imgenex 社) を、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 等に記載のアルカリ中和法および PEG 沈殿法を用いて、純度の高い DNA を取得した。

これらの DNA をトランスフェクションさせる前日に、コンフルエントになった、gag および pol 遺伝子を保有する 293 細胞を 1/5 希釈で 10cm ディッシュに継代し、一晚 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

トランスフェクションは以下の通りにおこなった。

pCLNC-Nkx2.5/Csx あるいは pCLNC-GATA4 レトロウイルスベクタープラスミド DNA 15 μ g と pCMV-Eco プラスミドベクター DNA 5 μ g を 250mM CaCl₂ (pH6.95) 0.5ml に加えて溶解させ、その溶液を 15ml のチューブに入れた 2×BBS [50mM BES(N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid), 280mM NaCl, 1.5mM Na₂HPO₄ (pH6.95)] 0.5ml に滴下して 10 分間室温で静置させた。その後、この DNA 溶液を、前日に用意した 293 細胞培地中に滴下させ、37°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。翌日、培地を交換し、更に 37°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

培地を交換して 2 日後に、培養上清を 0.45 μ m のフィルター (Millipore 社製) でろ過し、ウイルスベクターを含む溶液を回収した。

ウイルスベクターを導入される側の心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓細胞は、ウイルスをインフェクションさせる前日に 2×10⁴ 細胞/ウェルとなるように 6 ウェル・ディッシュに蒔いておいた。

上記で取得したウイルスベクターを含む溶液に、終濃度 8 μ g/ml となるように、Hexadimethrine bromide (polybrene) (Sigma 社製) を添加し、心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓細胞の培地と置換し、33°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。5 時間後、新しい IMDM 培地に交換し、更に 33°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

2 日間培養を行った後、G418 を終濃度 300 μ g/ml になるように添加し、さらに 3 日間培養した。この間に一部の細胞は死滅して浮遊した。生き残った細胞をトリプシンで浮遊させ、新しい培養皿に播種した。

このようにして、取得した Nkx2.5/Csx あるいは GATA4 の安定形質転換細胞について、上記実施例 3 の方法により分化誘導を行い、心筋細胞への分化の効率を検定した。その結果、これら転写因子の強制発現により、心筋細胞への分化の効率が促進されたことが分かった。

実施例 7. 心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓細胞でのテロメラーゼ活性

心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓細胞のテロメラーゼ活性は Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) 法により検討した (Oncor 社製 TRAPeze

Telomerase Detection Kit)。テロメラーゼ活性の測定は原則的に添付されていたプロトコールに従ったが、具体的には以下の通りに行った。まず、6cm 径の培養皿上で培養した心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞（およそ 10^6 個）を PBS で洗浄した後、200 μ l の 1 \times CHAPS 液を加え、氷上で 30 分間静置した。その後、溶液と共に細胞を 1.5ml 容遠沈管に回収し、14,000rpm で 20 分間遠心分離(4 $^{\circ}$ C、HITACHI 社製 himacCF15)し、上清を細胞抽出液として回収した。Protein assay (BioRad 社製) を用いて蛋白質含有量を測定したところ、上記条件で取得した心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞の細胞抽出液はおよそ 1mg/ml であった。

次にこの細胞抽出液を用いて、プロトコールに従ってテロメア伸長反応及び PCR 増幅を行った。Taq ポリメラーゼは EX Taq polymerase (宝酒造製) を用いた。反応終了後の試料は 10 \times 染色液 (0.25% bromophenol blue, 0.25% Xylene cyanol FF, 30% glycerol) を 1/10 量添加し、12.5% ポリアクリルアミドゲル (TRAPeze Telomerase Detection Kit のプロトコールに記載されている通り調製) に載せ、250mV 定電圧下で泳動した。泳動後、ゲルをサイバーグリーン (FMC 社製) で染色し、蛍光色素分析装置、Fluorolmager (Molecular Dynamics 社製) を用いて解析した。その結果、細胞抽出液の終濃度が 0.4 \sim 4 μ g/ml の試料でテロメラーゼ活性が検出された。

実施例 8. 心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞の心臓への移植

心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞をマウス心臓に移植するために、まず C3H/He マウス (日本チャールズリバー社製) に、エーテルを用いて麻酔の導入を行い、テルモ製のテルモシリンジ (1ml) を用いてチオペンタール 30mg の腹腔内投与することで麻酔の維持を行った。マウスの四肢をテープでコルク板に固定し、さらに首が反り返るように上顎をゴムでコルク板に固定した。この時点で左右の上肢及び右下肢に心電図電極を刺入し心電図のモニタリングを行った。続いて、メーヨ剪刀 (NONAKA RIKAKI CO., LTD NK-174-14) で頸部を気管にそって 1 cm ほど切開し、白十字社のベビー綿棒で甲状腺を左右に剥離をし、気管周囲の筋肉をマイクロ剪刀 (NONAKA RIKAKI CO., LTD NY-334-08) で切開し気管を露出した。ついでマイクロフェザー (メス) で気管を 1mm ほど切開しここから J 型に変型させたテルモ製サーフローフラッシュ (22G) の針を挿入し口腔から外に出し、この針をガイドにサーフロー

フラッシュ (20G) の外筒を気管内に挿入した。この外筒にレスピレータ (シナノ製作所製の MODEL SN-480-7) をつなぎ 100 パーセント酸素を 1ml/分で流し、一回換気量は 1ml、呼吸回数は 120/分で人工呼吸を開始した。このときにガイド針を挿入した穴からエアーがもれるので気管周囲の皮膚をモスキート鉗子 (NONAKA RIKAKI CO., LTD) を用いて気管をおおうようにして閉鎖した。つぎに、胸骨柄より頸部に向かい 2cm ほどメーヨ剪刀で切開、ついで胸骨を 2cm ほど胸骨柄から頸部に向かい切開をした。出血をバイポーラの電気メスで止血し、テルモ製のテルモシリンジ (1ml) にジーエルサイエンス社製の 30G の針 (メタルハブ交換針 N730) をつけて心尖部に実施例 1 で得た心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞を PBS に浮遊した液体を 0.1ml 注入した。ついで ETHICON 社製の 4-0 ETHIBOND X761 を用いて胸骨の閉鎖、皮膚の閉鎖を行い、同じ針糸で頸部の皮膚の閉鎖をした。自発呼吸の出現を確認しレスピレータをはずしインファントウオーマーを 37°C に加熱しこの中で覚醒を待った。なお本実験の操作は DESIGN FOR VISION 4.5× SURGICAL TELESCOPES を用いて行った。

移植した心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞が心筋に定着したことは、被移植マウスの心臓を摘出後、組織切片を作製し、GFP を認識する抗体で染色することにより確認した。

実施例 9. ラット骨髄からの心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞の取得と培養

5 週齢の Wistar rat (日本 SLC 株式会社) 雌 6 匹を頸椎脱臼した後、70% エタノールを充分かけ消毒した。次に足部の皮膚を広範囲に渡り切開し、大腿骨や脛骨を覆う筋肉を切除しながら、大腿骨と脛骨を取り出した。取り出した大腿骨と脛骨は PBS (GibcoBRL 社製) の入った 10cm 径培養皿 (岩城硝子社製) に移し、筋肉及び関節を完全に切除した。続いてこれらの骨の両端をハサミで切り、20G 注射針を付けた 10ml 用注射器 (テルモ社製) を用いて、培養液 (D-PBS、GibcoBRL 社製) の水流で骨髄中の内容物を押し出した。取得した細胞塊はさらに注射器を通して一様になるようにほぐした。このようにして得た細胞浮遊液は 50ml 容遠沈管 (BECTON DICKINSON 社製) に回収し、1,500rpm で 10 分間遠心分離し (TOMY 社製低速遠心機)、沈殿した細胞を 6ml の D-PBS 中に懸濁した。改良ノイバウエル型血球計算盤にて細胞数を計測した

ところ、回収した細胞は合計 2.6×10^9 個であった。大腿骨または脛骨 1 本当たりから 1×10^8 個の細胞を回収したことになる。回収した細胞は 1ml 当たり 1.3×10^8 個の濃度になるよう希釈し、50ml 容遠沈管に入った 1.073g/ml に調製された Percoll (Amersham Pharmacia Biotech 社製)/D-PBS 液 (25ml) 上に 5ml 重層した後、室温で 3,100rpm で 30 分間遠心分離した。遠心分離後、Percoll 液と細胞浮遊液との界面より細胞を回収し、D-PBS で 4 倍に希釈した後、2300rpm で 10 分間遠心分離し、分画した細胞集団を回収した。回収した細胞は 20% FCS、100 μ g/ml penicillin, 250 ng/ml streptomycin, 85 μ g/ml amphotericin (GibcoBRL 社製) を含む IMDM 培地 (GibcoBRL 社製) に懸濁した。この時点で再度細胞数を計測したところ、回収した骨髓由来細胞は合計 4.7×10^7 個あり、処理前の細胞の約 2% 相当を回収したことになる。このようにして分画した骨髓由来細胞は $2 \sim 5 \times 10^5$ 個/cm² になるように 10cm 径の動物細胞用の培養皿 (岩城硝子社製、以下 10cm 培養皿と略す) 3 枚に撒き、CO₂ 培養器 (タバイ社製) にて 33°C、5%CO₂ 濃度で培養を開始した。培地は 24 時間後、72 時間後にそれぞれ半分交換した。その 3~4 日後に培地を半分交換した。15 日経過し、コロニーが密集してきたので、細胞をトリプシン EDTA 処理ではがし、2/3 は 4ml の保存液 (10%DMSO、50%の骨髓由来細胞培養上清、40%の未使用上記培地) に懸濁し、2ml 容チューブ (住友ベークライト社製) に 1 本当たり 1ml 分注して凍結保存し、残り 1/3 は 10cm 培養皿 2 枚に蒔き直し継代した。

実施例 10. ラット骨髓由来細胞の心筋細胞への分化能の検討

上記で継代したラット骨髓由来細胞は密集したところを再度トリプシン EDTA 処理ではがし、6 ウェルプレート (BECTON DICKINSON 社製) には 1 ウェル当たり 5×10^4 個になるように、またヒトフィブロネクチンをコートした 6cm 径の培養皿 (BECTON DICKINSON 社製 Biocoat) には 1.3×10^5 個になるように細胞を蒔き直した。1 日後に 5-アザシチジン (Sigma 社製、終濃度 10 μ M) のみを加えたものと、5-アザシチジン、PDGF-BB (Pepro Tech EC LTD. 社製、終濃度 10ng/ml)、all-trans レチノイン酸 (RA、Sigma 社製、終濃度 10^{-9} M) を加えた二種類の異なる培養条件培養を行い、2 日間培養した後に培地を交換した (後者の場合は培地交換時に再度 PDGF、all-trans レチノイン酸を加え、2 日後と 4 日後にさらに加えた)。その 3~4 日後に、培地を交

換し、3週間培養した。その結果 5-アザシチジン、PDGF-BB、レチノイン酸を加えたもので筋管様細胞の分化が観察された。

産業上の利用可能性

本発明によれば、心筋細胞の破壊ならびに変性を伴う心疾患の治療ならびに治療薬の探索に有効な骨髄細胞、増殖因子、ビタミン、接着分子、及びこれらの利用法が提供される。

「配列表フリーテキスト」

配列番号 33 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 34 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 35 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 36 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 37 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 38 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 39 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 40 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 41 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 42 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 43 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 44 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 45 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 46 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 47 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 48 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 49 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 50 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 51 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 52 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 53 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 5 4 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 5 5 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 5 6 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 5 7 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 5 8 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 5 9 - 人工配列の説明: 合成 DNA

配列番号 6 0 - 人工配列の説明: 合成 DNA

請求の範囲

1. 骨髓から単離され、心筋細胞に分化する能力を有する細胞。
2. 少なくとも心筋細胞と脂肪細胞に分化する能力を有する多分化能幹細胞である、請求項 1 記載の細胞。
3. 心筋細胞のみに分化誘導される心筋幹細胞である、請求項 1 記載の細胞。
4. 心筋細胞のみに分化誘導される心筋前駆細胞である、請求項 1 記載の細胞。
5. 心室筋細胞に分化する能力を有する、請求項 1 記載の細胞。
6. 洞結節細胞に分化する能力を有する、請求項 1 記載の細胞。
7. 骨髓がほ乳動物由来のものである、請求項 1 記載の細胞。
8. ほ乳動物がヒト、ラットおよびマウスから選ばれるものである、請求項 7 記載の細胞
9. 細胞が、マウス骨髓由来幹細胞 BMSC(FERM BP-7043)である、請求項 1 記載の細胞。
10. 染色体 DNA の脱メチル化により心筋細胞に分化する能力を有する、請求項 1 記載の細胞。
11. 染色体 DNA の脱メチル化が、デメチラーゼ、5-アザシチジンおよびジメチルスルフォキシド (DMSO) からなる群から選ばれる少なくとも 1 種によるものであることを特徴とする、請求項 10 記載の細胞。
12. デメチラーゼが、配列番号 1 記載で表されるアミノ酸配列を有するデメチラーゼである、請求項 11 記載の細胞。
13. 胎児の心臓発生領域で発現している因子により心筋細胞への分化が促進される請求項 1 記載の細胞。
14. 胎児の心臓発生領域で発現している因子がサイトカイン、接着分子、ビタミンおよび転写因子からなる群から選ばれる少なくとも 1 種であることを特徴とする、請求項 13 記載の細胞。
15. 胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子により心筋細胞への分化が促進される請求項 1 記載の細胞。
16. 胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子がサイトカイン、接

着分子、ビタミンおよび転写因子からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする、請求項15記載の細胞。

17. サイトカインが血小板由来増殖因子 (PDGF) である、請求項13または16記載の細胞。

18. PDGFが配列番号3または5で表されるアミノ酸配列を有するPDGFである、請求項17記載の細胞。

19. 接着分子がフィブロネクチンである、請求項14または16記載の細胞。

20. ビタミンがレチノイン酸である、請求項14または16記載の細胞。

21. 転写因子が、Nkx2.5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2B、MEF-2C、MEF-2D、dHAND、eHAND、TEF-1、TEF-3 および TEF-5 からなる群から選ばれるものである、請求項14または16記載の細胞。

22. Nkx2.5/Csxが配列番号9で表されるアミノ酸配列を有するNkx2.5/Csxである、請求項21記載の細胞。

23. GATA4が配列番号11で表されるアミノ酸配列を有するGATA4である、請求項21記載の細胞。

24. MEF-2Aが配列番号13で表されるアミノ酸配列を有するMEF-2Aである、請求項21記載の細胞。

25. MEF-2Bが配列番号15で表されるアミノ酸配列を有するMEF-2Bである、請求項21記載の細胞。

26. MEF-2Cが配列番号17で表されるアミノ酸配列を有するMEF-2Cである、請求項21記載の細胞。

27. MEF-2Dが配列番号19で表されるアミノ酸配列を有するMEF-2Dである、請求項21記載の細胞。

28. dHANDが配列番号21で表されるアミノ酸配列を有するdHANDである、請求項21記載の細胞。

29. eHANDが配列番号23で表されるアミノ酸配列を有するeHANDである、請求項21記載の細胞。

30. TEF-1が配列番号25で表されるアミノ酸配列を有するTEF-1である、請求

項 21 記載の細胞。

31. TEF-3 が配列番号 27 で表されるアミノ酸配列を有する TEF-3 である、請求項 21 記載の細胞。

32. TEF-5 が配列番号 29 で表されるアミノ酸配列を有する TEF-5 である、請求項 21 記載の細胞。

33. 線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2) により心筋細胞への分化が抑制される請求項 1 記載の細胞。

34. FGF-2 が配列番号 7 または 8 記載のアミノ酸配列を有する FGF-2 である、請求項 33 記載の細胞。

35. 染色体 DNA の脱メチル化剤を用いて、骨髓由来の細胞から心筋を形成する方法。

36. 染色体 DNA の脱メチル化剤が、デメチラーゼ、5-アザシチジンおよび DMSO からなる群から選ばれる少なくとも 1 種であることを特徴とする、請求項 35 記載の方法。

37. デメチラーゼが、配列番号 1 記載のアミノ酸配列で表されるデメチラーゼである、請求項 36 記載の方法。

38. 胎児の心臓発生領域で発現している因子を用いることを特徴とする、骨髓由来の細胞から心筋を形成する方法。

39. 胎児の心臓発生領域で発現している因子がサイトカイン、接着分子、ビタミンおよび転写因子からなる群から選ばれる少なくとも 1 種であることを特徴とする、請求項 38 記載の方法。

40. 胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子を用いることを特徴とする、骨髓由来の細胞から心筋を形成する方法。

41. 胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子がサイトカイン、接着分子、ビタミンおよび転写因子からなる群から選ばれる少なくとも 1 種であることを特徴とする、請求項 40 記載の方法。

42. サイトカインが PDGF である、請求項 39 または 41 記載の方法。

43. PDGF が配列番号 3 または 5 記載のアミノ酸配列で表される PDGF である、請

求項 42 記載の方法。

44. 接着分子がフィブロネクチンである、請求項 39 または 41 記載の方法。

45. ビタミンがレチノイン酸である、請求項 39 または 41 記載の方法。

46. 転写因子が、Nkx2.5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2B、MEF-2C、MEF-2D、dHAND、eHAND、TEF-1、TEF-3 および TEF-5 からなる群から選ばれる、請求項 39 または 41 記載の方法。

47. Nkx2.5/Csx が、配列番号 9 で表されるアミノ酸配列を有する Nkx2.5/Csx である、請求項 46 記載の方法。

48. GATA4 が、配列番号 11 で表されるアミノ酸配列を有する GATA4 である、請求項 46 記載の方法。

49. MEF-2A が、配列番号 13 で表されるアミノ酸配列を有する MEF-2A である、請求項 46 記載の方法。

50. MEF-2B が、配列番号 15 で表されるアミノ酸配列を有する MEF-2B である、請求項 46 記載の方法。

51. MEF-2C が、配列番号 17 で表されるアミノ酸配列を有する MEF-2C である、請求項 46 記載の方法。

52. MEF-2D が、配列番号 19 で表されるアミノ酸配列を有する MEF-2D である、請求項 46 記載の方法。

53. dHAND が、配列番号 21 で表されるアミノ酸配列を有する dHAND である、請求項 46 記載の方法。

54. eHAND が、配列番号 23 で表されるアミノ酸配列を有する eHAND である、請求項 46 記載の方法。

55. TEF-1 が、配列番号 25 で表されるアミノ酸配列を有する TEF-1 である、請求項 46 記載の方法。

56. TEF-3 が、配列番号 27 で表されるアミノ酸配列を有する TEF-3 である、請求項 46 記載の方法。

57. TEF-5 が、配列番号 29 で表されるアミノ酸配列を有する TEF-5 である、請求項 46 記載の方法。

58. 染色体 DNA の脱メチル化剤を有効成分として含有することを特徴とする心筋形成剤。
59. 染色体 DNA の脱メチル化剤がデメチラーゼ、5-アザシチジンおよび DMSO からなる群から選ばれる少なくとも 1 種である、請求項 58 記載の心筋形成剤。
60. デメチラーゼが、配列番号 1 記載のアミノ酸配列で表されるデメチラーゼである、請求項 59 記載の心筋形成剤。
61. 胎児の心臓発生領域で発現している因子を有効成分として含有する心筋形成剤。
62. 胎児の心臓発生領域で発現している因子がサイトカイン、接着分子、ビタミンおよび転写因子からなる群から選ばれる少なくとも 1 種であることを特徴とする、請求項 61 記載の心筋形成剤。
63. 胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子を有効成分として含有することを特徴とする心筋形成剤。
64. 胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子がサイトカイン、接着分子、ビタミンおよび転写因子からなる群から選ばれる少なくとも 1 種であることを特徴とする、請求項 63 記載の心筋形成剤。
65. サイトカインが PDGF である、請求項 62 または 64 記載の心筋形成剤。
66. PDGF が配列番号 3 または 5 記載のアミノ酸配列で表される、請求項 65 記載の心筋形成剤。
67. 接着分子がフィブロネクチンである、請求項 62 または 64 記載の心筋形成剤。
68. ビタミンがレチノイン酸である、請求項 62 または 64 記載の心筋形成剤。
69. 転写因子が、Nkx2.5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2B、MEF-2C、MEF-2D、dHAND、eHAND、TEF-1、TEF-3 および TEF-5 からなる群から選ばれる、請求項 62 または 64 記載の心筋形成剤。
70. Nkx2.5/Csx が、配列番号 9 記載のアミノ酸配列で表される Nkx2.5/Csx である、請求項 69 記載の心筋形成剤。
71. GATA4 が、配列番号 11 記載のアミノ酸配列で表される GATA4 である、請求項 69 記載の心筋形成剤。
72. MEF-2A が、配列番号 13 記載のアミノ酸配列で表される MEF-2A である、請

求項 69 記載の心筋形成剤。

73. MEF-2B が、配列番号 1 5 記載のアミノ酸配列で表される MEF-2B である、請求項 69 記載の心筋形成剤。

74. MEF-2C が、配列番号 1 7 記載のアミノ酸配列で表される MEF-2C である、請求項 69 記載の心筋形成剤。

75. MEF-2D が、配列番号 1 9 記載のアミノ酸配列で表される MEF-2D である、請求項 69 記載の心筋形成剤。

76. dHAND が、配列番号 2 1 記載のアミノ酸配列で表される dHAND である、請求項 69 記載の心筋形成剤。

77. eHAND が、配列番号 2 3 記載のアミノ酸配列で表される eHAND である、請求項 69 記載の心筋形成剤。

78. TEF-1 が、配列番号 2 5 記載のアミノ酸配列で表される TEF-1 である、請求項 69 記載の心筋形成剤。

79. TEF-3 が、配列番号 2 7 記載のアミノ酸配列で表される TEF-3 である、請求項 69 記載の心筋形成剤。

80. TEF-5 が、配列番号 2 9 記載のアミノ酸配列で表される TEF-5 である、請求項 69 記載の心筋形成剤。

81. 請求項 1 ～34 のいずれか 1 項に記載の細胞を用いることを特徴とする、心臓疾患により破壊された心臓を再生する方法。

82. 請求項 1 ～34 のいずれか 1 項に記載の細胞を有効成分とする心臓再生治療薬。

83. 心臓の先天性遺伝子疾患での変異遺伝子に対する野生型遺伝子が導入された請求項 1 ～34 のいずれか 1 項に記載の細胞を用いることを特徴とする、先天性遺伝子疾患での変異遺伝子に対する野生型遺伝子を心筋へ特異的に輸送する方法。

84. 心臓の先天性遺伝子疾患での変異遺伝子に対する野生型遺伝子が導入された請求項 1 ～34 のいずれか 1 項に記載の細胞を有効成分として含有する心臓疾患治療薬。

85. 請求項 1 ～34 のいずれか 1 項に記載の細胞を免疫原として用いることを特徴とする、該細胞を特異的に認識する抗体を取得する方法。

86. 請求項 85 記載の方法で取得された抗体を用いることを特徴とする、ヒト骨髓

から心筋細胞への分化能を有する成体骨髄由来細胞を単離・精製する方法。

87. 請求項 1～34 のいずれか 1 項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞に特異的な表面抗原を取得する方法。

88. 請求項 1～34 のいずれか 1 項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞を増殖する因子をスクリーニングする方法。

89. 請求項 1～34 のいずれか 1 項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞の心筋細胞への分化を誘導する因子をスクリーニングする方法。

90. 請求項 1～34 のいずれか 1 項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞を不死化する因子をスクリーニングする方法。

91. 請求項 1～34 のいずれか 1 項に記載の細胞にテロメラーゼを発現させることを特徴とする、該細胞の不死化方法。

92. テロメラーゼが、配列番号 31 記載で表されるアミノ酸配列を有するテロメラーゼである請求項 91 記載の方法。

93. テロメラーゼを発現させることにより、不死化させた請求項 1～34 のいずれか 1 項に記載の細胞を有効成分として含有する心臓疾患治療薬。

94. テロメラーゼが、配列番号 31 記載で表されるアミノ酸配列を有するテロメラーゼである請求項 93 記載の治療薬。

95. 請求項 1～34 のいずれか 1 項に記載の細胞を含んだ培養上清。

96. 請求項 95 記載の培養上清を用いることを特徴とする、請求項 1 記載の細胞を心筋細胞に分化誘導する方法。

要 約 書

本発明は、心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞の単離、精製、培養、分化誘導法に関する。また本発明は、各種サイトカイン、転写因子などを用いた、心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞の増殖方法および心筋細胞への分化を制御する方法に関する。本発明はさらに、心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞に特異的な表面抗原の取得方法、該表面抗原をコードする遺伝子の取得方法、該表面抗原特異的な抗体の取得方法、心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞の増殖および心筋細胞への分化に関与する蛋白質および遺伝子の取得方法に関する。本発明はまた、心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞を用いた各種心臓疾患の治療薬に関する。

配 列 表

SEQUENCING LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<111> ADULT BONE MARROW-DERIVED CELLS HAVING THE POTENTIAL TO DIFFERENTIATE
INTO CARDIOMYOCYTES /

<130>11217W01

<140>

<141>

<150>H11-372826

<151>1999-12-28

<160>60

<170>PatentIn Ver.2.0

<210> 1

<211> 411

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Arg Ala His Pro Gly Gly Gly Arg Cys Cys Pro Glu Gln Glu Glu

1

5

10

15

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(1236)

<400> 2

atg cgc gcg cac ccg ggg gga ggc cgc tgc tgc ccg gag cag gag gag 48
Met Arg Ala His Pro Gly Gly Gly Arg Cys Cys Pro Glu Gln Glu Glu
1 5 10 15
ggg gag agt gcg gcg ggc ggc agc ggc gct ggc ggc gac tcc gcc ata 96
Gly Glu Ser Ala Ala Gly Gly Ser Gly Ala Gly Gly Asp Ser Ala Ile
20 25 30
gag cag ggg ggc cag ggc agc gcg ctc gcc ccg tcc ccg gtg agc ggc 144
Glu Gln Gly Gly Gln Gly Ser Ala Leu Ala Pro Ser Pro Val Ser Gly
35 40 45
gtg cgc agg gaa ggc gct cgg ggc ggc ggc cgt ggc cgg ggg cgg tgg 192
Val Arg Arg Glu Gly Ala Arg Gly Gly Gly Arg Gly Arg Gly Arg Trp
50 55 60
aag cag gcg ggc cgg ggc ggc ggc gtc tgt ggc cgt ggc cgg ggc cgg 240
Lys Gln Ala Gly Arg Gly Gly Gly Val Cys Gly Arg Gly Arg Gly Arg
65 70 75 80
ggc cgt ggc cgg gga cgg gga cgg ggc cgg ggc cgg ggc cgc ggc cgt 288
Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg
85 90 95
ccc ccg agt ggc ggc agc ggc ctt ggc ggc gac ggc ggc ggc tgc ggc 336
Pro Pro Ser Gly Gly Ser Gly Leu Gly Gly Asp Gly Gly Gly Cys Gly

100	105	110	
ggc ggc ggc agc ggt ggc ggc ggc gcc ccc cgg cgg gag ccg gtc cct			384
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Pro Arg Arg Glu Pro Val Pro			
115	120	125	
ttc ccg tcg ggg agc gcg ggg ccg ggg ccc agg gga ccc cgg gcc acg			432
Phe Pro Ser Gly Ser Ala Gly Pro Gly Pro Arg Gly Pro Arg Ala Thr			
130	135	140	
gag agc ggg aag agg atg gat tgc ccg gcc ctc ccc ccc gga tgg aag			480
Glu Ser Gly Lys Arg Met Asp Cys Pro Ala Leu Pro Pro Gly Trp Lys			
145	150	155	160
aag gag gaa gtg atc cga aaa tct ggg cta agt gct ggc aag agc gat			528
Lys Glu Glu Val Ile Arg Lys Ser Gly Leu Ser Ala Gly Lys Ser Asp			
165	170	175	
gtc tac tac ttc agt cca agt ggt aag aag ttc aga agc aag cct cag			576
Val Tyr Tyr Phe Ser Pro Ser Gly Lys Lys Phe Arg Ser Lys Pro Gln			
180	185	190	
ttg gca agg tac ctg gga aat act gtt gat ctc agc agt ttt gac ttc			624
Leu Ala Arg Tyr Leu Gly Asn Thr Val Asp Leu Ser Ser Phe Asp Phe			
195	200	205	
aga act gga aag atg atg cct agt aaa tta cag aag aac aaa cag aga			672
Arg Thr Gly Lys Met Met Pro Ser Lys Leu Gln Lys Asn Lys Gln Arg			
210	215	220	
ctg cga aac gat cct ctc aat caa aat aag ggt aaa cca gac ttg aat			720
Leu Arg Asn Asp Pro Leu Asn Gln Asn Lys Gly Lys Pro Asp Leu Asn			
225	230	235	240
aca aca ttg cca att aga caa aca gca tca att ttc aaa caa ccg gta			768

Thr Thr Leu Pro Ile Arg Gln Thr Ala Ser Ile Phe Lys Gln Pro Val	
245 250 255	
acc aaa gtc aca aat cat cct agt aat aaa gtg aaa tca gac cca caa	816
Thr Lys Val Thr Asn His Pro Ser Asn Lys Val Lys Ser Asp Pro Gln	
260 265 270	
cga atg aat gaa cag cca cgt cag ctt ttc tgg gag aag agg cta caa	864
Arg Met Asn Glu Gln Pro Arg Gln Leu Phe Trp Glu Lys Arg Leu Gln	
275 280 285	
gga ctt agt gca tca gat gta aca gaa caa att ata aaa acc atg gaa	912
Gly Leu Ser Ala Ser Asp Val Thr Glu Gln Ile Ile Lys Thr Met Glu	
290 295 300	
cta ccc aaa ggt ctt caa gga gtt ggt cca ggt agc aat gat gag acc	960
Leu Pro Lys Gly Leu Gln Gly Val Gly Pro Gly Ser Asn Asp Glu Thr	
305 310 315 320	
ctt tta tct gct gtt gcc agt gct ttg cac aca agc tct gcg cca atc	1008
Leu Leu Ser Ala Val Ala Ser Ala Leu His Thr Ser Ser Ala Pro Ile	
325 330 335	
aca ggg caa gtc tcc gct gct gtg gaa aag aac cct gct gtt tgg ctt	1056
Thr Gly Gln Val Ser Ala Ala Val Glu Lys Asn Pro Ala Val Trp Leu	
340 345 350	
aac aca tct caa ccc ctc tgc aaa gct ttt att gtc aca gat gaa gac	1104
Asn Thr Ser Gln Pro Leu Cys Lys Ala Phe Ile Val Thr Asp Glu Asp	
355 360 365	
atc agg aaa cag gaa gag cga gta cag caa gta cgc aag aaa ttg gaa	1152
Ile Arg Lys Gln Glu Glu Arg Val Gln Gln Val Arg Lys Lys Leu Glu	
370 375 380	

gaa gca ctg atg gca gac atc ttg tcg cga gct gct gat aca gaa gag 1200

Glu Ala Leu Met Ala Asp Ile Leu Ser Arg Ala Ala Asp Thr Glu Glu

385 390 395 400

atg gat att gaa atg gac agt gga gat gaa gcc 1233

Met Asp Ile Glu Met Asp Ser Gly Asp Glu Ala

405 410 /

<210> 3

<211> 196

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Arg Thr Leu Ala Cys Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala

1 5 10 15

His Val Leu Ala Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg

20 25 30

Leu Ala Arg Ser Gln Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu

35 40 45

Glu Ile Asp Ser Val Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg

50 55 60

Ala His Gly Val His Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu

65 70 75 80

Pro Ile Arg Arg Lys Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys

85 90 95

Lys Thr Arg Thr Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro

100 105 110

Thr Ser Ala Asn Phe Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg

115	120	125
Cys Thr Gly Cys Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg		
130	135	140
Val His His Arg Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys		
145	150	155
Lys Pro Lys Leu Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu		
165	170	175
Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp		
180	185	190
Thr Asp Val Arg		
195		
<210> 4		
<211> 588		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<220>		
<221> CDS		
<223> (1)..(591)		
<400> 4		
atg agg acc ttg gct tgc ctg ctg ctc ctc ggc tgc gga tac ctc gcc	48	
Met Arg Thr Leu Ala Cys Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala		
1 5 10 15		
cat gtt ctg gcc gag gaa gcc gag atc ccc cgc gag gtg atc gag agg	96	
His Val Leu Ala Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg		
20 25 30		
ctg gcc cgc agt cag atc cac agc atc cgg gac ctc cag cga ctc ctg	144	

Leu Ala Arg Ser Gln Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu	
35 40 45	
gag ata gac tcc gta ggg agt gag gat tct ttg gac acc agc ctg aga	192
Glu Ile Asp Ser Val Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg	
50 55 60	
gct cac ggg gtc cac gcc act aag cat gtg ccc gag aag cgg ccc ctg	240
Ala His Gly Val His Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu	
65 70 75 80	
ccc att cgg agg aag aga agc atc gag gaa gct gtc ccc gct gtc tgc	288
Pro Ile Arg Arg Lys Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys	
85 90 95	
aag acc agg acg gtc att tac gag att cct cgg agt cag gtc gac ccc	336
Lys Thr Arg Thr Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro	
100 105 110	
acg tcc gcc aac ttc ctg atc tgg ccc ccg tgc gtg gag gtg aaa cgc	384
Thr Ser Ala Asn Phe Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg	
115 120 125	
tgc acc ggc tgc tgc aac acg agc agt gtc aag tgc cag ccc tcc cgc	432
Cys Thr Gly Cys Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg	
130 135 140	
gtc cac cac cgc agc gtc aag gtg gcc aag gtg gaa tac gtc agg aag	480
Val His His Arg Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys	
145 150 155 160	
aag cca aaa tta aaa gaa gtc cag gtg agg tta gag gag cat ttg gag	528
Lys Pro Lys Leu Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu	
165 170 175	

tgc gcc tgc gcg acc aca agc ctg aat ccg gat tat cgg gaa gag gac 576

Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp

180

185

190

acg gat gtg agg

588

Thr Asp Val Arg

195

<210> 5

<211> 241

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Asn Arg Cys Trp Ala Leu Phe Leu Ser Leu Cys Cys Tyr Leu Arg

1

5

10

15

Leu Val Ser Ala Glu Gly Asp Pro Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met

20

25

30

Leu Ser Asp His Ser Ile Arg Ser Phe Asp Asp Leu Gln Arg Leu Leu

35

40

45

His Gly Asp Pro Gly Glu Glu Asp Gly Ala Glu Leu Asp Leu Asn Met

50

55

60

Thr Arg Ser His Ser Gly Gly Glu Leu Glu Ser Leu Ala Arg Gly Arg

65

70

75

80

Arg Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ile Ala Glu Pro Ala Met Ile Ala Glu

85

90

95

Cys Lys Thr Arg Thr Glu Val Phe Glu Ile Ser Arg Arg Leu Ile Asp

100

105

110

Arg Thr Asn Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln

115	120	125
Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr		
130	135	140
Gln Val Gln Leu Arg Pro Val Gln Val Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg		
145	150	155
Lys Lys/Pro Ile Phe Lys Lys Ala Thr Val Thr Leu Glu Asp His Leu		160
165	170	175
Ala Cys Lys Cys Glu Thr Val Ala Ala Ala Arg Pro Val Thr Arg Ser		
180	185	190
Pro Gly Gly Ser Gln Glu Gln Arg Ala Lys Thr Pro Gln Thr Arg Val		
195	200	205
Thr Ile Arg Thr Val Arg Val Arg Arg Pro Pro Lys Gly Lys His Arg		
210	215	220
Lys Phe Lys His Thr His Asp Lys Thr Ala Leu Lys Glu Thr Leu Gly		
225	230	235
		240
Ala		
<210> 6		
<211> 723		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<220>		
<221> CDS		
<223> (1)..(726)		
<400> 6		
atg aat cgc tgc tgg gcg ctc ttc ctg tct ctc tgc tgc tac ctg cgt	48	
Met Asn Arg Cys Trp Ala Leu Phe Leu Ser Leu Cys Cys Tyr Leu Arg		

1	5	10	15	
ctg gtc agc gcc gag ggg gac ccc att ccc gag gag ctt tat gag atg	96			
Leu Val Ser Ala Glu Gly Asp Pro Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met				
20	25	30		
ctg agt gac cac tcg atc cgc tcc ttt gat gat ctc caa cgc ctg ctg	144			
Leu Ser Asp His Ser Ile Arg Ser Phe Asp Asp Leu Gln Arg Leu Leu				
35	40	45		
cac gga gac ccc gga gag gaa gat ggg gcc gag ttg gac ctg aac atg	192			
His Gly Asp Pro Gly Glu Glu Asp Gly Ala Glu Leu Asp Leu Asn Met				
50	55	60		
acc cgc tcc cac tct gga ggc gag ctg gag agc ttg gct cgt gga aga	240			
Thr Arg Ser His Ser Gly Gly Glu Leu Glu Ser Leu Ala Arg Gly Arg				
65	70	75	80	
agg agc ctg ggt tcc ctg acc att gct gag ccg gcc atg atc gcc gag	288			
Arg Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ile Ala Glu Pro Ala Met Ile Ala Glu				
85	90	95		
tgc aag acg cgc acc gag gtg ttc gag atc tcc cgg cgc ctc ata gac	336			
Cys Lys Thr Arg Thr Glu Val Phe Glu Ile Ser Arg Arg Leu Ile Asp				
100	105	110		
cgc acc aac gcc aac ttc ctg gtg tgg ccg ccc tgt gtg gag gtg cag	384			
Arg Thr Asn Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln				
115	120	125		
cgc tgc tcc ggc tgc tgc aac aac cgc aac gtg cag tgc cgc ccc acc	432			
Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr				
130	135	140		
cag gtg cag ctg cga cct gtc cag gtg aga aag atc gag att gtg cgg	480			

Gly	Ser	Gly	Ala	Phe	Pro	Pro	Gly	His	Phe	Lys	Asp	Pro	Lys	Arg	Leu	
20				25				30								
Tyr	Cys	Lys	Asn	Gly	Gly	Phe	Phe	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Asp	Gly	Arg	
35				40				45								
Val	Asp	Gly	Val	Arg	Glu	Lys	Ser	Asp	Pro	His	Ile	Lys	Leu	Gln	Leu	
50		/		55				60								
Gln	Ala	Glu	Glu	Arg	Gly	Val	Val	Ser	Ile	Lys	Gly	Val	Cys	Ala	Asn	
65		70		75		80										
Arg	Tyr	Leu	Ala	Met	Lys	Glu	Asp	Gly	Arg	Leu	Leu	Ala	Ser	Lys	Cys	
85				90				95								
Val	Thr	Asp	Glu	Cys	Phe	Phe	Phe	Glu	Arg	Leu	Glu	Ser	Asn	Asn	Tyr	
100				105				110								
Asn	Thr	Tyr	Arg	Ser	Arg	Lys	Tyr	Thr	Ser	Trp	Tyr	Val	Ala	Leu	Lys	
115				120				125								
Arg	Thr	Gly	Gln	Tyr	Lys	Leu	Gly	Ser	Lys	Thr	Gly	Pro	Gly	Gln	Lys	
130		135		140												
Ala	Ile	Leu	Phe	Leu	Pro	Met	Ser	Ala	Lys	Ser						
145		150														

<210> 8

<211> 465

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(468)

<400> 8

130 135 140
 gct ata ctt ttt ctt cca atg tct gct aag agc 465
 Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala Lys Ser
 145 150 155
 <210> 9
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 Met Phe Pro Ser Pro Ala Leu Thr Pro Thr Pro Phe Ser Val Lys Asp
 1 5 10 15
 Ile Leu Asn Leu Glu Gln Gln Gln Arg Ser Leu Ala Ala Ala Gly Glu
 20 25 30
 Leu Ser Ala Arg Leu Glu Ala Thr Leu Ala Pro Ser Ser Cys Met Leu
 35 40 45
 Ala Ala Phe Lys Pro Glu Ala Tyr Ala Gly Pro Glu Ala Ala Ala Pro
 50 55 60
 Gly Leu Pro Glu Leu Arg Ala Glu Leu Gly Arg Ala Pro Ser Pro Ala
 65 70 75 80
 Lys Cys Ala Ser Ala Phe Pro Ala Ala Pro Ala Phe Tyr Pro Arg Ala
 85 90 95
 Tyr Ser Asp Pro Asp Pro Ala Lys Asp Pro Arg Ala Glu Lys Lys Glu
 100 105 110
 Leu Cys Ala Leu Gln Lys Ala Val Glu Leu Glu Lys Thr Glu Ala Asp
 115 120 125
 Asn Ala Glu Arg Pro Arg Ala Arg Arg Arg Lys Pro Arg Val Leu

130	135	140	
Phe Ser Gln Ala Gln Val Tyr Glu Leu Glu Arg Arg Phe Lys Gln Gln			
145	150	155	160
Arg Tyr Leu Ser Ala Pro Glu Arg Asp Gln Leu Ala Ser Val Leu Lys			
	165	170	175
Leu Thr Ser Thr Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Tyr Lys			
	180	185	190
Cys Lys Arg Gln Arg Gln Asp Gln Thr Leu Glu Leu Val Gly Leu Pro			
	195	200	205
Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ala Arg Arg Ile Ala Val Pro Val Leu Val			
	210	215	220
Arg Asp Gly Lys Pro Cys Leu Gly Asp Ser Ala Pro Tyr Ala Pro Ala			
225	230	235	240
Tyr Gly Val Gly Leu Asn Pro Tyr Gly Tyr Asn Ala Tyr Pro Ala Tyr			
	245	250	255
Pro Gly Tyr Gly Gly Ala Ala Cys Ser Pro Gly Tyr Ser Cys Thr Ala			
	260	265	270
Ala Tyr Pro Ala Gly Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala Thr Ala Ala Ala			
	275	280	285
Asn Asn Asn Phe Val Asn Phe Gly Val Gly Asp Leu Asn Ala Val Gln			
	290	295	300
Ser Pro Gly Ile Pro Gln Ser Asn Ser Gly Val Ser Thr Leu His Gly			
305	310	315	320
Ile Arg Ala Trp			

<210> 10

<211> 972

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(975)

<400> 10

```
atg ttc ccc agc cct gct ctc acg ccc acg ccc ttc tca gtc aaa gac 48
Met Phe Pro Ser Pro Ala Leu Thr Pro Thr Pro Phe Ser Val Lys Asp
      1              5              10              15
atc cta aac ctg gaa cag cag cag cgc agc ctg gct gcc gcc gga gag 96
Ile Leu Asn Leu Glu Gln Gln Gln Arg Ser Leu Ala Ala Ala Gly Glu
      20              25              30
ctc tct gcc cgc ctg gag gcg acc ctg gcg ccc tcc tcc tgc atg ctg 144
Leu Ser Ala Arg Leu Glu Ala Thr Leu Ala Pro Ser Ser Cys Met Leu
      35              40              45
gcc gcc ttc aag cca gag gcc tac gct ggg ccc gag gcg gct gcg ccg 192
Ala Ala Phe Lys Pro Glu Ala Tyr Ala Gly Pro Glu Ala Ala Ala Pro
      50              55              60
ggc ctc cca gag ctg cgc gca gag ctg ggc cgc gcg cct tca ccg gcc 240
Gly Leu Pro Glu Leu Arg Ala Glu Leu Gly Arg Ala Pro Ser Pro Ala
      65              70              75              80
aag tgt gcg tct gcc ttt ccc gcc gcc ccc gcc ttc tat cca cgt gcc 288
Lys Cys Ala Ser Ala Phe Pro Ala Ala Pro Ala Phe Tyr Pro Arg Ala
      85              90              95
tac agc gac ccc gac cca gcc aag gac cct aga gcc gaa aag aaa gag 336
```


Tyr Ser Asp Pro Asp Pro Ala Lys Asp Pro Arg Ala Glu Lys Lys Glu	
100 105 110	
ctg tgc gcg ctg cag aag gcg gtg gag ctg gag aag aca gag gcg gac	384
Leu Cys Ala Leu Gln Lys Ala Val Glu Leu Glu Lys Thr Glu Ala Asp	
115 120 125	
/ aac gcg gag cgg ccc cgg gcg cga cgg cgg agg aag ccg cgc gtg ctc	432
Asn Ala Glu Arg Pro Arg Ala Arg Arg Arg Arg Lys Pro Arg Val Leu	
130 135 140	
ttc tgc cag gcg cag gtc tat gag ctg gag cgg cgc ttc aag cag cag	480
Phe Ser Gln Ala Gln Val Tyr Glu Leu Glu Arg Arg Phe Lys Gln Gln	
145 150 155 160	
cgg tac ctg tgc gcc ccc gaa cgc gac cag ctg gcc agc gtg ctg aaa	528
Arg Tyr Leu Ser Ala Pro Glu Arg Asp Gln Leu Ala Ser Val Leu Lys	
165 170 175	
ctc acg tcc acg cag gtc aag atc tgg ttc cag aac cgg cgc tac aag	576
Leu Thr Ser Thr Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Tyr Lys	
180 185 190	
tgc aag cgg cag cgg cag gac cag act ctg gag ctg gtg ggg ctg ccc	624
Cys Lys Arg Gln Arg Gln Asp Gln Thr Leu Glu Leu Val Gly Leu Pro	
195 200 205	
ccg ccg ccg ccg ccg cct gcc cgc agg atc gcg gtg cca gtg ctg gtg	672
Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ala Arg Arg Ile Ala Val Pro Val Leu Val	
210 215 220	
cgc gat ggc aag cca tgc cta ggg gac tgc gcg ccc tac gcg cct gcc	720
Arg Asp Gly Lys Pro Cys Leu Gly Asp Ser Ala Pro Tyr Ala Pro Ala	
225 230 235 240	

tac ggc gtg ggc ctc aat ccc tac ggt tat aac gcc tac ccc gcc tat 768

Tyr Gly Val Gly Leu Asn Pro Tyr Gly Tyr Asn Ala Tyr Pro Ala Tyr

245

250

255

ccg ggt tac ggc ggc gcg gcc tgc agc cct ggc tac agc tgc act gcc 816

Pro Gly Tyr Gly Gly Ala Ala Cys Ser Pro Gly Tyr Ser Cys Thr Ala

260

/ 265

270

gct tac ccc gcc ggg cct tcc cca gcg cag ccg gcc act gcc gcc gcc 864

Ala Tyr Pro Ala Gly Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala Thr Ala Ala Ala

275

280

285

aac aac aac ttc gtg aac ttc ggc gtc ggg gac ttg aat gcg gtt cag 912

Asn Asn Asn Phe Val Asn Phe Gly Val Gly Asp Leu Asn Ala Val Gln

290

295

300

agc ccc ggg att ccg cag agc aac tcg gga gtg tcc acg ctg cat ggt 960

Ser Pro Gly Ile Pro Gln Ser Asn Ser Gly Val Ser Thr Leu His Gly

305

310

315

320

atc cga gcc tgg

972

Ile Arg Ala Trp

324

<210> 11

<211> 442

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Tyr Gln Ser Leu Ala Met Ala Ala Asn His Gly Pro Pro Pro Gly

1

5

10

15

Ala Tyr Gln Ala Gly Gly Pro Gly Pro Phe Met His Gly Ala Gly Ala

20	25	30
Ala Ser Ser Pro Val Tyr Leu Pro Thr Pro Arg Val Pro Ser Ser Val		
35	40	45
Leu Gly Leu Ser Tyr Leu Gln Gly Gly Gly Ala Gly Ser Ala Ser Gly		
50	55	60
Gly Pro Ser Gly Gly Ser Pro Gly Gly Ala Ala Ser Gly Ala Gly Pro		
65	70	75
Gly Thr Gln Gln Gly Ser Pro Gly Trp Ser Gln Ala Gly Ala Thr Gly		
85	90	95
Ala Ala Tyr Thr Pro Pro Pro Val Ser Pro Arg Phe Ser Phe Pro Gly		
100	105	110
Thr Thr Gly Ser Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg Glu		
115	120	125
Ala Ala Ala Tyr Ser Ser Gly Gly Gly Ala Ala Gly Ala Gly Leu Ala		
130	135	140
Gly Arg Glu Gln Tyr Gly Arg Ala Gly Phe Ala Gly Ser Tyr Ser Ser		
145	150	155
Pro Tyr Pro Ala Tyr Met Ala Asp Val Gly Ala Ser Trp Ala Ala Ala		
165	170	175
Ala Ala Ala Ser Ala Gly Pro Phe Asp Ser Pro Val Leu His Ser Leu		
180	185	190
Pro Gly Arg Ala Asn Pro Ala Ala Arg His Pro Asn Leu Asp Met Phe		
195	200	205
Asp Asp Phe Ser Glu Gly Arg Glu Cys Val Asn Cys Gly Ala Met Ser		
210	215	220
Thr Pro Leu Trp Arg Arg Asp Gly Thr Gly His Tyr Leu Cys Asn Ala		

225	230	235	240
Cys Gly Leu Tyr His Lys Met Asn Gly Ile Asn Arg Pro Leu Ile Lys			
245	250	255	
Pro Gln Arg Arg Leu Ser Ala Ser Arg Arg Val Gly Leu Ser Cys Ala			
260	265	270	
Asn Cys Gln Thr Thr Thr Thr Thr Leu Trp Arg Arg Asn Ala Glu Gly			
275	280	285	
Glu Pro Val Cys Asn Ala Cys Gly Leu Tyr Met Lys Leu His Gly Val			
290	295	300	
Pro Arg Pro Leu Ala Met Arg Lys Glu Gly Ile Gln Thr Arg Lys Arg			
305	310	315	320
Lys Pro Lys Asn Leu Asn Lys Ser Lys Thr Pro Ala Ala Pro Ser Gly			
325	330	335	
Ser Glu Ser Leu Pro Pro Ala Ser Gly Ala Ser Ser Asn Ser Ser Asn			
340	345	350	
Ala Thr Thr Ser Ser Ser Glu Glu Met Arg Pro Ile Lys Thr Glu Pro			
355	360	365	
Gly Leu Ser Ser His Tyr Gly His Ser Ser Ser Val Ser Gln Thr Phe			
370	375	380	
Ser Val Ser Ala Met Ser Gly His Gly Pro Ser Ile His Pro Val Leu			
385	390	395	400
Ser Ala Leu Lys Leu Ser Pro Gln Gly Tyr Ala Ser Pro Val Ser Gln			
405	410	415	
Ser Pro Gln Thr Ser Ser Lys Gln Asp Ser Trp Asn Ser Leu Val Leu			
420	425	430	
Ala Asp Ser His Gly Asp Ile Ile Thr Ala			

435

440

<210> 12

<211> 1326

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(1329)

<400> 12

```

atg tat cag agc ttg gcc atg gcc gcc aac cac ggg ccg ccc ccc ggt 48
Met Tyr Gln Ser Leu Ala Met Ala Ala Asn His Gly Pro Pro Pro Gly
  1           5           10           15
gcc tac cag gcg ggc ggc ccc ggc ccc ttc atg cac ggc gcg ggc gcc 96
Ala Tyr Gln Ala Gly Gly Pro Gly Pro Phe Met His Gly Ala Gly Ala
      20           25           30
gcg tcc tcg cca gtc tac ctg ccc aca ccg cgg gtg ccc tcc tcc gtt 144
Ala Ser Ser Pro Val Tyr Leu Pro Thr Pro Arg Val Pro Ser Ser Val
      35           40           45
ctg ggc ctg tcc tac ctc cag ggc gga ggc gcg ggc tct gcg tcc gga 192
Leu Gly Leu Ser Tyr Leu Gln Gly Gly Gly Ala Gly Ser Ala Ser Gly
      50           55           60
ggc ccc tcg ggc ggc agc ccc ggt ggg gcc gcg tct ggt gcg ggg ccc 240
Gly Pro Ser Gly Gly Ser Pro Gly Gly Ala Ala Ser Gly Ala Gly Pro
      65           70           75           80
ggg acc cag cag ggc agc ccg gga tgg agc cag gcg gga gcg acc gga 288
Gly Thr Gln Gln Gly Ser Pro Gly Trp Ser Gln Ala Gly Ala Thr Gly

```

	85	90	95	
gcc gct tac acc ccg ccg ccg gtg tgc ccg cgc ttc tcc ttc ccg ggg				336
Ala Ala Tyr Thr Pro Pro Pro Val Ser Pro Arg Phe Ser Phe Pro Gly				
	100	105	110	
acc acc ggg tcc ctg gcg gcg gcg gcg gcg gct gcc gcc gcc cgg gaa				384
Thr Thr Gly Ser Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg Glu				
	115	120	125	
gct gcg gcc tac agc agt ggc ggc gga gcg gcg ggt gcg ggc ctg gcg				432
Ala Ala Ala Tyr Ser Ser Gly Gly Gly Ala Ala Gly Ala Gly Leu Ala				
	130	135	140	
ggc cgc gag cag tac ggg cgc gcc ggc ttc gcg ggc tcc tac tcc agc				480
Gly Arg Glu Gln Tyr Gly Arg Ala Gly Phe Ala Gly Ser Tyr Ser Ser				
145	150	155	160	
ccc tac ccg gct tac atg gcc gac gtg ggc gcg tcc tgg gcc gca gcc				528
Pro Tyr Pro Ala Tyr Met Ala Asp Val Gly Ala Ser Trp Ala Ala Ala				
	165	170	175	
gcc gcc gcc tcc gcc ggc ccc ttc gac agc ccg gtc ctg cac agc ctg				576
Ala Ala Ala Ser Ala Gly Pro Phe Asp Ser Pro Val Leu His Ser Leu				
	180	185	190	
ccc ggc cgg gcc aac ccg gcc gcc cga cac ccc aat ctc gat atg ttt				624
Pro Gly Arg Ala Asn Pro Ala Ala Arg His Pro Asn Leu Asp Met Phe				
	195	200	205	
gac gac ttc tca gaa ggc aga gag tgt gtc aac tgt ggg gct atg tcc				672
Asp Asp Phe Ser Glu Gly Arg Glu Cys Val Asn Cys Gly Ala Met Ser				
	210	215	220	
acc ccg ctc tgg agg cga gat ggg acg ggt cac tat ctg tgc aac gcc				720

ggc ctg tca tct cac tac ggg cac agc agc tcc gtg tcc cag acg ttc 1152

Gly Leu Ser Ser His Tyr Gly His Ser Ser Ser Val Ser Gln Thr Phe

370

375

380

tca gtc agt gcg atg tct ggc cat ggg ccc tcc atc cac cct gtc ctc 1200

Ser Val Ser Ala Met Ser Gly His Gly Pro Ser Ile His Pro Val Leu

385

390

395

400

tcg gcc ctg aag ctc tcc cca caa ggc tat gcg tct ccc gtc agc cag 1248

Ser Ala Leu Lys Leu Ser Pro Gln Gly Tyr Ala Ser Pro Val Ser Gln

405

410

415

tct cca cag acc agc tcc aag cag gac tct tgg aac agt ctg gtc ttg 1296

Ser Pro Gln Thr Ser Ser Lys Gln Asp Ser Trp Asn Ser Leu Val Leu

420

425

430

gcc gac agt cac ggg gac ata atc act gcg

1326

Ala Asp Ser His Gly Asp Ile Ile Thr Ala

435

440

<210> 13

<211> 507

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Gly Arg Lys Lys Ile Gln Ile Thr Arg Ile Met Asp Glu Arg Asn

1

5

10

15

Arg Gln Val Thr Phe Thr Lys Arg Lys Phe Gly Leu Met Lys Lys Ala

20

25

30

Tyr Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Cys Glu Ile Ala Leu Ile Ile Phe

35

40

45

Asn Ser Ser Asn Lys Leu Phe Gln Tyr Ala Ser Thr Asp Met Asp Lys			
50	55	60	
Val Leu Leu Lys Tyr Thr Glu Tyr Asn Glu Pro His Glu Ser Arg Thr			
65	70	75	80
Asn Ser Asp Ile Val Glu Ala Leu Asn Lys Lys Glu His Arg Gly Cys			
85	90	95	
Asp Ser Pro Asp Pro Asp Thr Ser Tyr Val Leu Thr Pro His Thr Glu			
100	105	110	
Glu Lys Tyr Lys Lys Ile Asn Glu Glu Phe Asp Asn Met Met Arg Asn			
115	120	125	
His Lys Ile Ala Pro Gly Leu Pro Pro Gln Asn Phe Ser Met Ser Val			
130	135	140	
Thr Val Pro Val Thr Ser Pro Asn Ala Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Gly			
145	150	155	160
Ser Ser Leu Val Ser Pro Ser Leu Ala Ala Ser Ser Thr Leu Thr Asp			
165	170	175	
Ser Ser Met Leu Ser Pro Pro Gln Thr Thr Leu His Arg Asn Val Ser			
180	185	190	
Pro Gly Ala Pro Gln Arg Pro Pro Ser Thr Gly Asn Ala Gly Gly Met			
195	200	205	
Leu Ser Thr Thr Asp Leu Thr Val Pro Asn Gly Ala Gly Ser Ser Pro			
210	215	220	
Val Gly Asn Gly Phe Val Asn Ser Arg Ala Ser Pro Asn Leu Ile Gly			
225	230	235	240
Ala Thr Gly Ala Asn Ser Leu Gly Lys Val Met Pro Thr Lys Ser Pro			
245	250	255	

Pro	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn	Leu	Gly	Met	Asn	Ser	Arg	Lys	Pro	Asp
			260					265						270	
Leu	Arg	Val	Val	Ile	Pro	Pro	Ser	Ser	Lys	Gly	Met	Met	Pro	Pro	Leu
			275					280						285	
Ser	Glu	Glu	Glu	Glu	Leu	Glu	Leu	Asn	Thr	Gln	Arg	Ile	Ser	Ser	Ser
			290		/			295						300	
Gln	Ala	Thr	Gln	Pro	Leu	Ala	Thr	Pro	Val	Val	Ser	Val	Thr	Thr	Pro
			305			310					315				320
Ser	Leu	Pro	Pro	Gln	Gly	Leu	Val	Tyr	Ser	Ala	Met	Pro	Thr	Ala	Tyr
						325				330					335
Asn	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ser	Ala	Asp	Leu	Ser	Ala	Leu	Gln	Gly
			340					345						350	
Phe	Asn	Ser	Pro	Gly	Met	Leu	Ser	Leu	Gly	Gln	Val	Ser	Ala	Trp	Gln
			355					360						365	
Gln	His	His	Leu	Gly	Gln	Ala	Ala	Leu	Ser	Ser	Leu	Val	Ala	Gly	Gly
			370					375						380	
Gln	Leu	Ser	Gln	Gly	Ser	Asn	Leu	Ser	Ile	Asn	Thr	Asn	Gln	Asn	Ile
			385				390				395				400
Ser	Ile	Lys	Ser	Glu	Pro	Ile	Ser	Pro	Pro	Arg	Asp	Arg	Met	Thr	Pro
						405				410				415	
Ser	Gly	Phe	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Pro	Pro
			420					425						430	
Pro	Pro	Pro	Gln	Pro	Gln	Pro	Gln	Pro	Pro	Gln	Pro	Gln	Pro	Arg	Gln
			435					440						445	
Glu	Met	Gly	Arg	Ser	Pro	Val	Asp	Ser	Leu	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
			450					455						460	

Tyr Asp Gly Ser Asp Arg Glu Asp Pro Arg Gly Asp Phe His Ser Pro
 465 470 475 480
 Ile Val Leu Gly Arg Pro Pro Asn Thr Glu Asp Arg Glu Ser Pro Ser
 485 490 495
 Val Lys Arg Met Arg Met Asp Ala Trp Val Thr
 500 505 /

<210> 14

<211> 1521

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(1524)

<400> 14

atg ggg cgg aag aaa ata caa atc aca cgc ata atg gat gaa agg aac	48
Met Gly Arg Lys Lys Ile Gln Ile Thr Arg Ile Met Asp Glu Arg Asn	
1 5 10 15	
cga cag gtc act ttt aca aag aga aag ttt gga tta atg aag aaa gcc	96
Arg Gln Val Thr Phe Thr Lys Arg Lys Phe Gly Leu Met Lys Lys Ala	
20 25 30	
tat gaa ctt agt gtg ctc tgt gac tgt gaa ata gca ctc atc att ttc	144
Tyr Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Cys Glu Ile Ala Leu Ile Ile Phe	
35 40 45	
aac agc tct aac aaa ctg ttt caa tat gct agc act gat atg gac aaa	192
Asn Ser Ser Asn Lys Leu Phe Gln Tyr Ala Ser Thr Asp Met Asp Lys	
50 55 60	

195	200	205	
ttg agc act aca gac ctc aca gtg cca aat gga gct gga agc agt cca			672
Leu Ser Thr Thr Asp Leu Thr Val Pro Asn Gly Ala Gly Ser Ser Pro			
210	215	220	
gtg ggg aat gga ttt gta aac tca aga gct tct cca aat ttg att gga			720
Val Gly Asn Gly Phe Val Asn Ser Arg Ala Ser Pro Asn Leu Ile Gly			
225	230	235	240
gct act ggt gca aat agc tta ggc aaa gtc atg cct aca aag tct ccc			768
Ala Thr Gly Ala Asn Ser Leu Gly Lys Val Met Pro Thr Lys Ser Pro			
	245	250	255
cct cca cca ggt ggt ggt aat ctt gga atg aac agt agg aaa cca gat			816
Pro Pro Pro Gly Gly Gly Asn Leu Gly Met Asn Ser Arg Lys Pro Asp			
260	265	270	
ctt cga gtt gtc atc ccc cct tca agc aag ggc atg atg cct cca cta			864
Leu Arg Val Val Ile Pro Pro Ser Ser Lys Gly Met Met Pro Pro Leu			
275	280	285	
tcg gag gaa gag gaa ttg gag ttg aac acc caa agg atc agt agt tct			912
Ser Glu Glu Glu Glu Leu Glu Leu Asn Thr Gln Arg Ile Ser Ser Ser			
290	295	300	
caa gcc act caa cct ctt gct acc cca gtc gtg tct gtg aca acc cca			960
Gln Ala Thr Gln Pro Leu Ala Thr Pro Val Val Ser Val Thr Thr Pro			
305	310	315	320
agc ttg cct ccg caa gga ctt gtg tac tca gca atg ccg act gcc tac			1008
Ser Leu Pro Pro Gln Gly Leu Val Tyr Ser Ala Met Pro Thr Ala Tyr			
	325	330	335
aac act gat tat tca ctg acc agc gct gac ctg tca gcc ctt caa ggc			1056

Asn Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ser Ala Asp Leu Ser Ala Leu Gln Gly	
340 345 350	
ttc aac tcg cca gga atg ctg tcg ctg gga cag gtg tcg gcc tgg cag	1104
Phe Asn Ser Pro Gly Met Leu Ser Leu Gly Gln Val Ser Ala Trp Gln	
355 360 365	
cag cac cac cta gga caa gca gcc ctc agc tct ctt gtt gct gga ggg	1152
Gln His His Leu Gly Gln Ala Ala Leu Ser Ser Leu Val Ala Gly Gly	
370 375 380	
cag tta tct cag ggt tcc aat tta tcc att aat acc aac caa aac atc	1200
Gln Leu Ser Gln Gly Ser Asn Leu Ser Ile Asn Thr Asn Gln Asn Ile	
385 390 395 400	
agc atc aag tcc gaa ccg att tca cct cct cgg gat cgt atg acc cca	1248
Ser Ile Lys Ser Glu Pro Ile Ser Pro Pro Arg Asp Arg Met Thr Pro	
405 410 415	
tcg ggc ttc cag cag cag cag cag cag cag cag cag cag cag ccg ccg	1296
Ser Gly Phe Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Pro Pro	
420 425 430	
cca cca ccg cag ccc cag cca caa ccc ccg cag ccc cag ccc cga cag	1344
Pro Pro Pro Gln Pro Gln Pro Gln Pro Pro Gln Pro Gln Pro Arg Gln	
435 440 445	
gaa atg ggg cgc tcc cct gtg gac agt ctg agc agc tct agt agc tcc	1392
Glu Met Gly Arg Ser Pro Val Asp Ser Leu Ser Ser Ser Ser Ser Ser	
450 455 460	
tat gat ggc agt gat cgg gag gat cca cgg ggc gac ttc cat tct cca	1440
Tyr Asp Gly Ser Asp Arg Glu Asp Pro Arg Gly Asp Phe His Ser Pro	
465 470 475 480	

att gtg ctt ggc cga ccc cca aac act gag gac aga gaa agc cct tct 1488

Ile Val Leu Gly Arg Pro Pro Asn Thr Glu Asp Arg Glu Ser Pro Ser

485

490

495

gta aag cga atg agg atg gac gcg tgg gtg acc

1521

Val Lys Arg Met Arg Met Asp Ala Trp Val Thr

/

500

505

<210> 15

<211> 365

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Gly Arg Lys Lys Ile Gln Ile Ser Arg Ile Leu Asp Gln Arg Asn

1

5

10

15

Arg Gln Val Thr Phe Thr Lys Arg Lys Phe Gly Leu Met Lys Lys Ala

20

25

30

Tyr Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Cys Glu Ile Ala Leu Ile Ile Phe

35

40

45

Asn Ser Ala Asn Arg Leu Phe Gln Tyr Ala Ser Thr Asp Met Asp Arg

50

55

60

Val Leu Leu Lys Tyr Thr Glu Tyr Ser Glu Pro His Glu Ser Arg Thr

65

70

75

80

Asn Thr Asp Ile Leu Glu Thr Leu Lys Arg Arg Gly Ile Gly Leu Asp

85

90

95

Gly Pro Glu Leu Glu Pro Asp Glu Gly Pro Glu Glu Pro Gly Glu Lys

100

105

110

Phe Arg Arg Leu Ala Gly Glu Gly Gly Asp Pro Ala Leu Pro Arg Pro

115	120	125	
Arg Leu Tyr Pro Ala Ala Pro Ala Met Pro Ser Pro Asp Val Val Tyr			
130	135	140	
Gly Ala Leu Pro Pro Pro Gly Cys Asp Pro Ser Gly Leu Gly Glu Ala			
145	150	155	160
Leu Pro Ala Gln Ser Arg Pro Ser Pro Phe Arg Pro Ala Ala Pro Lys			
165	170	175	
Ala Gly Pro Pro Gly Leu Val His Pro Leu Phe Ser Pro Ser His Leu			
180	185	190	
Thr Ser Lys Thr Pro Pro Pro Leu Tyr Leu Pro Thr Glu Gly Arg Arg			
195	200	205	
Ser Asp Leu Pro Gly Gly Leu Ala Gly Pro Arg Gly Gly Leu Asn Thr			
210	215	220	
Ser Arg Ser Leu Tyr Ser Gly Leu Gln Asn Pro Cys Ser Thr Ala Thr			
225	230	235	240
Pro Gly Pro Pro Leu Gly Ser Phe Pro Phe Leu Pro Gly Gly Pro Pro			
245	250	255	
Val Gly Ala Glu Ala Trp Ala Arg Arg Val Pro Gln Pro Ala Ala Pro			
260	265	270	
Pro Arg Arg Pro Pro Gln Ser Ala Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Arg			
275	280	285	
Pro Pro Gly Ala Pro Ala Thr Phe Leu Arg Pro Ser Pro Ile Pro Cys			
290	295	300	
Ser Ser Pro Gly Pro Trp Gln Ser Leu Cys Gly Leu Gly Pro Pro Cys			
305	310	315	320
Ala Gly Cys Pro Trp Pro Thr Ala Gly Pro Gly Arg Arg Ser Pro Gly			

	325	330	335	
Gly Thr Ser Pro Glu Arg Ser Pro Gly Thr Ala Arg Ala Arg Gly Asp				
	340	345	350	
Pro Thr Ser Leu Gln Ala Ser Ser Glu Lys Thr Gln Gln				
	355	360		

<210> 16
 <211> 1095
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <223> (1)..(1098)
 <400> 16

atg ggg agg aaa aaa atc cag atc tcc cgc atc ctg gac caa agg aat	48
Met Gly Arg Lys Lys Ile Gln Ile Ser Arg Ile Leu Asp Gln Arg Asn	
1 5 10 15	
cgg cag gtg acg ttc acc aag cgg aag ttc ggg ctg atg aag aag gcc	96
Arg Gln Val Thr Phe Thr Lys Arg Lys Phe Gly Leu Met Lys Lys Ala	
20 25 30	
tat gag ctg agc gtg ctc tgt gac tgt gag ata gcc ctc atc atc ttc	144
Tyr Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Cys Glu Ile Ala Leu Ile Ile Phe	
35 40 45	
aac agc gcc aac cgc ctc ttc cag tat gcc agc acg gac atg gac cgt	192
Asn Ser Ala Asn Arg Leu Phe Gln Tyr Ala Ser Thr Asp Met Asp Arg	
50 55 60	
gtg ctg ctg aag tac aca gag tac agc gag ccc cac gag agc cgc acc	240

Val	Leu	Leu	Lys	Tyr	Thr	Glu	Tyr	Ser	Glu	Pro	His	Glu	Ser	Arg	Thr	
65					70					75					80	
aac	act	gac	atc	ctc	gag	acg	ctg	aag	cgg	agg	ggc	att	ggc	ctc	gat	288
Asn	Thr	Asp	Ile	Leu	Glu	Thr	Leu	Lys	Arg	Arg	Gly	Ile	Gly	Leu	Asp	
			85						90					95		
ggg	cca	gag	ctg	gag	ccg	gat	gaa	ggg	cct	gag	gag	cca	gga	gag	aag	336
Gly	Pro	Glu	Leu	Glu	Pro	Asp	Glu	Gly	Pro	Glu	Glu	Pro	Gly	Glu	Lys	
			100					105					110			
ttt	cgg	agg	ctg	gca	ggc	gaa	ggg	ggt	gat	ccg	gcc	ttg	ccc	cga	ccc	384
Phe	Arg	Arg	Leu	Ala	Gly	Glu	Gly	Gly	Asp	Pro	Ala	Leu	Pro	Arg	Pro	
			115					120					125			
cgg	ctg	tat	cct	gca	gct	cct	gct	atg	ccc	agc	cca	gat	gtg	gta	tac	432
Arg	Leu	Tyr	Pro	Ala	Ala	Pro	Ala	Met	Pro	Ser	Pro	Asp	Val	Val	Tyr	
			130				135						140			
ggg	gcc	tta	ccg	cca	cca	ggc	tgt	gac	ccc	agt	ggg	ctt	ggg	gaa	gca	480
Gly	Ala	Leu	Pro	Pro	Pro	Gly	Cys	Asp	Pro	Ser	Gly	Leu	Gly	Glu	Ala	
			145				150				155			160		
ctg	ccc	gcc	cag	agc	cgc	cca	tct	ccc	ttc	cga	cca	gca	gcc	ccc	aaa	528
Leu	Pro	Ala	Gln	Ser	Arg	Pro	Ser	Pro	Phe	Arg	Pro	Ala	Ala	Pro	Lys	
					165				170					175		
gcc	ggg	ccc	cca	ggc	ctg	gtg	cac	cct	ctc	ttc	tca	cca	agc	cac	ctc	576
Ala	Gly	Pro	Pro	Gly	Leu	Val	His	Pro	Leu	Phe	Ser	Pro	Ser	His	Leu	
					180				185					190		
acc	agc	aag	aca	cca	ccc	cca	ctg	tac	ctg	ccg	acg	gaa	ggg	cgg	agg	624
Thr	Ser	Lys	Thr	Pro	Pro	Pro	Leu	Tyr	Leu	Pro	Thr	Glu	Gly	Arg	Arg	
					195				200					205		

tca gac ctg cct ggt ggc ctg gct ggg ccc cga ggg gga cta aac acc	672
Ser Asp Leu Pro Gly Gly Leu Ala Gly Pro Arg Gly Gly Leu Asn Thr	
210 215 220	
tcc aga agc ctc tac agt ggc ctg cag aac ccc tgc tcc act gca act	720
Ser Arg Ser Leu Tyr Ser Gly Leu Gln Asn Pro Cys Ser Thr Ala Thr	
225 230 235 240	
ccc gga ccc cca ctg ggg agc ttc ccc ttc ctc ccc gga ggc ccc cca	768
Pro Gly Pro Pro Leu Gly Ser Phe Pro Phe Leu Pro Gly Gly Pro Pro	
245 250 255	
gtg ggg gcc gaa gcc tgg gcg agg agg gtc ccc caa ccc gcg gcg cct	816
Val Gly Ala Glu Ala Trp Ala Arg Arg Val Pro Gln Pro Ala Ala Pro	
260 265 270	
ccc cgc cga ccc ccc cag tca gca tca agt ctg agc gcc tct ctc cgg	864
Pro Arg Arg Pro Pro Gln Ser Ala Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Arg	
275 280 285	
ccc ccg ggg gcc ccg gcg act ttc cta aga cct tcc cct atc cct tgc	912
Pro Pro Gly Ala Pro Ala Thr Phe Leu Arg Pro Ser Pro Ile Pro Cys	
290 295 300	
tcc tcg ccc ggt ccc tgg cag agc ctc tgc ggc ctg ggc ccg ccc tgc	960
Ser Ser Pro Gly Pro Trp Gln Ser Leu Cys Gly Leu Gly Pro Pro Cys	
305 310 315 320	
gcc ggc tgc cct tgg ccg acg gct ggc ccc ggt agg aga tca ccc ggt	1008
Ala Gly Cys Pro Trp Pro Thr Ala Gly Pro Gly Arg Arg Ser Pro Gly	
325 330 335	
ggc acc agc cca gag cgc tcg cca ggt acg gcg agg gca cgt ggg gac	1056
Gly Thr Ser Pro Glu Arg Ser Pro Gly Thr Ala Arg Ala Arg Gly Asp	

340	345	350	
ccc acc tcc ctc cag gcc tct tca gag aag acc caa cag			1095
Pro Thr Ser Leu Gln Ala Ser Ser Glu Lys Thr Gln Gln			
355	360	365	
<210> 17			
<211> 465			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 17			
Met Gly Arg Lys Lys Ile Gln Ile Thr Arg Ile Met Asp Glu Arg Asn			
1	5	10	15
Arg Gln Val Thr Phe Thr Lys Arg Lys Phe Gly Leu Met Lys Lys Ala			
20	25	30	
Tyr Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Cys Glu Ile Ala Leu Ile Ile Phe			
35	40	45	
Asn Ser Thr Asn Lys Leu Phe Gln Tyr Ala Ser Thr Asp Met Asp Lys			
50	55	60	
Val Leu Leu Lys Tyr Thr Glu Tyr Asn Glu Pro His Glu Ser Arg Thr			
65	70	75	80
Asn Ser Asp Ile Val Glu Thr Leu Arg Lys Lys Gly Leu Asn Gly Cys			
85	90	95	
Asp Ser Pro Asp Pro Asp Ala Asp Asp Ser Val Gly His Ser Pro Glu			
100	105	110	
Ser Glu Asp Lys Tyr Arg Lys Ile Asn Glu Asp Ile Asp Leu Met Ile			
115	120	125	
Ser Arg Gln Arg Leu Cys Ala Val Pro Pro Pro Asn Phe Glu Met Pro			

130	135	140	
Val Ser Ile Pro Val Ser Ser His Asn Ser Leu Val Tyr Ser Asn Pro			
145	150	155	160
Val Ser Ser Leu Gly Asn Pro Asn Leu Leu Pro Leu Ala His Pro Ser			
	165	170	175
Leu Gln Arg Asn Ser Met Ser Pro Gly Val Thr His Arg Pro Pro Ser			
	180	185	190
Ala Gly Asn Thr Gly Gly Leu Met Gly Gly Asp Leu Thr Ser Gly Ala			
	195	200	205
Gly Thr Ser Ala Gly Asn Gly Tyr Gly Asn Pro Arg Asn Ser Pro Gly			
	210	215	220
Leu Leu Val Ser Pro Gly Asn Leu Asn Lys Asn Met Gln Ala Lys Ser			
225	230	235	240
Pro Pro Pro Met Asn Leu Gly Met Asn Asn Arg Lys Pro Asp Leu Arg			
	245	250	255
Val Leu Ile Pro Pro Gly Ser Lys Asn Thr Met Pro Ser Val Asn Gln			
	260	265	270
Arg Ile Asn Asn Ser Gln Ser Ala Gln Ser Leu Ala Thr Pro Val Val			
	275	280	285
Ser Val Ala Thr Pro Thr Leu Pro Gly Gln Gly Met Gly Gly Tyr Pro			
	290	295	300
Ser Ala Ile Ser Thr Thr Tyr Gly Thr Glu Tyr Ser Leu Ser Ser Ala			
305	310	315	320
Asp Leu Ser Ser Leu Ser Gly Phe Asn Thr Ala Ser Ala Leu His Leu			
	325	330	335
Gly Ser Val Thr Gly Trp Gln Gln Gln His Leu His Asn Met Pro Pro			

340	345	350
Ser Ala Leu Ser Gln Leu Gly Ala Cys Thr Ser Thr His Leu Ser Gln		
355	360	365
Ser Ser Asn Leu Ser Leu Pro Ser Thr Gln Ser Leu Asn Ile Lys Ser		
370	375	380
Glu Pro Val Ser Pro Pro Arg Asp Arg Thr Thr Thr Pro Ser Arg Tyr		
385	390	395
Pro Gln His Thr Arg His Glu Ala Gly Arg Ser Pro Val Asp Ser Leu		
405	410	415
Ser Ser Cys Ser Ser Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Arg Glu Asp His Arg		
420	425	430
Asn Glu Phe His Ser Pro Ile Gly Leu Thr Arg Pro Ser Pro Asp Glu		
435	440	445
Arg Glu Ser Pro Ser Val Lys Arg Met Arg Leu Ser Glu Gly Trp Ala		
450	455	460

Thr

<210> 18

<211> 1395

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(1398)

<400> 18

atg ggg aga aaa aag att cag att acg agg att atg gat gaa cgt aac 48

Met Gly Arg Lys Lys Ile Gln Ile Thr Arg Ile Met Asp Glu Arg Asn

1	5	10	15	
aga cag gtg aca ttt aca aag agg aaa ttt ggg ttg atg aag aag gct	96			
Arg Gln Val Thr Phe Thr Lys Arg Lys Phe Gly Leu Met Lys Lys Ala				
20	25	30		
tat gag ctg agc gtg ctg tgt gac tgt gag att gcg ctg atc atc ttc	144			
Tyr Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Cys Glu Ile Ala Leu Ile Ile Phe				
35	40	45		
aac agc acc aac aag ctg ttc cag tat gcc agc acc gac atg gac aaa	192			
Asn Ser Thr Asn Lys Leu Phe Gln Tyr Ala Ser Thr Asp Met Asp Lys				
50	55	60		
gtg ctt ctc aag tac acg gag tac aac gag ccg cat gag agc cgg aca	240			
Val Leu Leu Lys Tyr Thr Glu Tyr Asn Glu Pro His Glu Ser Arg Thr				
65	70	75	80	
aac tca gac atc gtg gag acg ttg aga aag aag ggc ctt aat ggc tgt	288			
Asn Ser Asp Ile Val Glu Thr Leu Arg Lys Lys Gly Leu Asn Gly Cys				
85	90	95		
gac agc cca gac ccc gat gcg gac gat tcc gta ggt cac agc cct gag	336			
Asp Ser Pro Asp Pro Asp Ala Asp Asp Ser Val Gly His Ser Pro Glu				
100	105	110		
tct gag gac aag tac agg aaa att aac gaa gat att gat cta atg atc	384			
Ser Glu Asp Lys Tyr Arg Lys Ile Asn Glu Asp Ile Asp Leu Met Ile				
115	120	125		
agc agg caa aga ttg tgt gct gtt cca cct ccc aac ttc gag atg cca	432			
Ser Arg Gln Arg Leu Cys Ala Val Pro Pro Pro Asn Phe Glu Met Pro				
130	135	140		
gtc tcc atc cca gtg tcc agc cac aac agt ttg gtg tac agc aac cct	480			

tcc gta gca act cct act tta cca gga caa gga atg gga gga tat cca	912
Ser Val Ala Thr Pro Thr Leu Pro Gly Gln Gly Met Gly Gly Tyr Pro	
290 295 300	
tca gcc att tca aca aca tat ggt acc gag tac tct ctg agt agt gca	960
Ser Ala Ile Ser Thr Thr Tyr Gly Thr Glu Tyr Ser Leu Ser Ser Ala	
305 310 315 320	
gac ctg tca tct ctg tct ggg ttt aac acc gcc agc gct ctt cac ctt	1008
Asp Leu Ser Ser Leu Ser Gly Phe Asn Thr Ala Ser Ala Leu His Leu	
325 330 335	
ggt tca gta act ggc tgg caa cag caa cac cta cat aac atg cca cca	1056
Gly Ser Val Thr Gly Trp Gln Gln Gln His Leu His Asn Met Pro Pro	
340 345 350	
tct gcc ctc agt cag ttg gga gct tgc act agc act cat tta tct cag	1104
Ser Ala Leu Ser Gln Leu Gly Ala Cys Thr Ser Thr His Leu Ser Gln	
355 360 365	
agt tca aat ctc tcc ctg cct tct act caa agc ctc aac atc aag tca	1152
Ser Ser Asn Leu Ser Leu Pro Ser Thr Gln Ser Leu Asn Ile Lys Ser	
370 375 380	
gaa cct gtt tct cct cct aga gac cgt acc acc acc cct tcg aga tac	1200
Glu Pro Val Ser Pro Pro Arg Asp Arg Thr Thr Thr Pro Ser Arg Tyr	
385 390 395 400	
cca caa cac acg cgc cac gag gcg ggg aga tct cct gtt gac agc ttg	1248
Pro Gln His Thr Arg His Glu Ala Gly Arg Ser Pro Val Asp Ser Leu	
405 410 415	
agc agc tgt agc agt tcg tac gac ggg agc gac cga gag gat cac cgg	1296
Ser Ser Cys Ser Ser Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Arg Glu Asp His Arg	

420	425	430	
aac gaa ttc cac tcc ccc att gga ctc acc aga cct tcg ccg gac gaa			1344
Asn Glu Phe His Ser Pro Ile Gly Leu Thr Arg Pro Ser Pro Asp Glu			
435	440	445	
agg gaa agt ccc tca gtc aag cgc atg cga ctt tct gaa gga tgg gca			1392
Arg Glu Ser Pro Ser Val Lys Arg Met Arg Leu Ser Glu Gly Trp Ala			
450	455	460	
aca			1395
Thr			
465			
<210> 19			
<211> 521			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 19			
Met Gly Arg Lys Lys Ile Gln Ile Gln Arg Ile Thr Asp Glu Arg Asn			
1 5 10 15			
Arg Gln Val Thr Phe Thr Lys Arg Lys Phe Gly Leu Met Lys Lys Ala			
20 25 30			
Tyr Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Cys Glu Ile Ala Leu Ile Ile Phe			
35 40 45			
Asn His Ser Asn Lys Leu Phe Gln Tyr Ala Ser Thr Asp Met Asp Lys			
50 55 60			
Val Leu Leu Lys Tyr Thr Glu Tyr Asn Glu Pro His Glu Ser Arg Thr			
65 70 75 80			
Asn Ala Asp Ile Ile Glu Thr Leu Arg Lys Lys Gly Phe Asn Gly Cys			

85	90	95
Asp Ser Pro Glu Pro Asp Gly Glu Asp Ser Leu Glu Gln Ser Pro Leu		
100	105	110
Leu Glu Asp Lys Tyr Arg Arg Ala Ser Glu Glu Leu Asp Gly Leu Phe		
115	120	125
Arg Arg Tyr Gly Ser Thr Val Pro Ala Pro Asn Phe Ala Met Pro Val		
130	135	140
Thr Val Pro Val Ser Asn Gln Ser Ser Leu Gln Phe Ser Asn Pro Ser		
145	150	155
Gly Ser Leu Val Thr Pro Ser Leu Val Thr Ser Ser Leu Thr Asp Pro		
165	170	175
Arg Leu Leu Ser Pro Gln Gln Pro Ala Leu Gln Arg Asn Ser Val Ser		
180	185	190
Pro Gly Leu Pro Gln Arg Pro Ala Ser Ala Gly Ala Met Leu Gly Gly		
195	200	205
Asp Leu Asn Ser Ala Asn Gly Ala Cys Pro Ser Pro Val Gly Asn Gly		
210	215	220
Tyr Val Ser Ala Arg Ala Ser Pro Gly Leu Leu Pro Val Ala Asn Gly		
225	230	235
Asn Ser Leu Asn Lys Val Ile Pro Ala Lys Ser Pro Pro Pro Pro Thr		
245	250	255
His Ser Thr Gln Leu Gly Ala Pro Ser Arg Lys Pro Asp Leu Arg Val		
260	265	270
Ile Thr Ser Gln Ala Gly Lys Gly Leu Met His His Leu Thr Glu Asp		
275	280	285
His Leu Asp Leu Asn Asn Ala Gln Arg Leu Gly Val Ser Gln Ser Thr		

290	295	300	
His Ser Leu Thr Thr Pro Val Val Ser Val Ala Thr Pro Ser Leu Leu			
305	310	315	320
Ser Gln Gly Leu Pro Phe Ser Ser Met Pro Thr Ala Tyr Asn Thr Asp			
	325	330	335
Tyr Gln Leu Thr Ser Ala Glu Leu Ser Ser Leu Pro Ala Phe Ser Ser			
	340	345	350
Pro Gly Gly Leu Ser Leu Gly Asn Val Thr Ala Trp Gln Gln Pro Gln			
	355	360	365
Gln Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Gln Pro Pro Gln Gln Gln Pro Pro			
	370	375	380
Gln Pro Gln Gln Pro Gln Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro			
385	390	395	400
Pro Gln Gln Gln Ser His Leu Val Pro Val Ser Leu Ser Asn Leu Ile			
	405	410	415
Pro Gly Ser Pro Leu Pro His Val Gly Ala Ala Leu Thr Val Thr Thr			
	420	425	430
His Pro His Ile Ser Ile Lys Ser Glu Pro Val Ser Pro Ser Arg Glu			
	435	440	445
Arg Ser Pro Ala Pro Pro Pro Pro Ala Val Phe Pro Ala Ala Arg Pro			
	450	455	460
Glu Pro Gly Asp Gly Leu Ser Ser Pro Ala Gly Gly Ser Tyr Glu Thr			
465	470	475	480
Gly Asp Arg Asp Asp Gly Arg Gly Asp Phe Gly Pro Thr Leu Gly Leu			
	485	490	495
Leu Arg Pro Ala Pro Glu Pro Glu Ala Glu Gly Ser Ala Val Lys Arg			

500	505	510
Met Arg Leu Asp Thr Trp Thr Leu Lys		
515	520	
<210> 20		
<211> 1563		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<220>		
<221> CDS		
<223> (1)..(1566)		
<400> 20		
atg ggg agg aaa aag att cag atc cag cga atc acc gac gag cgg aac		48
Met Gly Arg Lys Lys Ile Gln Ile Gln Arg Ile Thr Asp Glu Arg Asn		
1 5 10 15		
cga cag gtg act ttc acc aag cgg aag ttt ggc ctg atg aag aag gcg		96
Arg Gln Val Thr Phe Thr Lys Arg Lys Phe Gly Leu Met Lys Lys Ala		
20 25 30		
tat gag ctg agc gtg cta tgt gac tgc gag atc gca ctc atc atc ttc		144
Tyr Glu Leu Ser Val Leu Cys Asp Cys Glu Ile Ala Leu Ile Ile Phe		
35 40 45		
aac cac tcc aac aag ctg ttc cag tac gcc agc acc gac atg gac aag		192
Asn His Ser Asn Lys Leu Phe Gln Tyr Ala Ser Thr Asp Met Asp Lys		
50 55 60		
gtg ctg ctc aag tac acg gag tac aat gag cca cac gag agc cgc acc		240
Val Leu Leu Lys Tyr Thr Glu Tyr Asn Glu Pro His Glu Ser Arg Thr		
65 70 75 80		

aac gcc gac atc atc gag acc ctg agg aag aag ggc ttc aat ggc tgc	288
Asn Ala Asp Ile Ile Glu Thr Leu Arg Lys Lys Gly Phe Asn Gly Cys	
85 90 95	
gac agc ccc gag ccc gac ggg gag gac tcg ctg gaa cag agc ccc ctg	336
Asp Ser Pro Glu Pro Asp Gly Glu Asp Ser Leu Glu Gln Ser Pro Leu	
100 105 110	
ctg gag gac aag tac cga cgc gcc agc gag gag ctc gac ggg ctc ttc	384
Leu Glu Asp Lys Tyr Arg Arg Ala Ser Glu Glu Leu Asp Gly Leu Phe	
115 120 125	
cgg cgc tat ggg tca act gtc ccg gcc ccc aac ttt gcc atg cct gtc	432
Arg Arg Tyr Gly Ser Thr Val Pro Ala Pro Asn Phe Ala Met Pro Val	
130 135 140	
acg gtg ccc gtg tcc aat cag agc tca ctg cag ttc agc aat ccc agc	480
Thr Val Pro Val Ser Asn Gln Ser Ser Leu Gln Phe Ser Asn Pro Ser	
145 150 155 160	
ggc tcc ctg gtc acc cct tcc ctg gtg aca tca tcc ctc acg gac ccg	528
Gly Ser Leu Val Thr Pro Ser Leu Val Thr Ser Ser Leu Thr Asp Pro	
165 170 175	
cgg ctc ctg tcc ccc cag cag cca gca cta cag agg aac agt gtg tct	576
Arg Leu Leu Ser Pro Gln Gln Pro Ala Leu Gln Arg Asn Ser Val Ser	
180 185 190	
cct ggc ctg ccc cag cgg cca gct agt gcg ggg gcc atg ctg ggg ggt	624
Pro Gly Leu Pro Gln Arg Pro Ala Ser Ala Gly Ala Met Leu Gly Gly	
195 200 205	
gac ctg aac agt gct aac gga gcc tgc ccc agc cct gtt ggg aat ggc	672
Asp Leu Asn Ser Ala Asn Gly Ala Cys Pro Ser Pro Val Gly Asn Gly	

210	215	220	
tac gtc agt gct cgg gct tcc cct ggc ctc ctc cct gtg gcc aat ggc	720		
Tyr Val Ser Ala Arg Ala Ser Pro Gly Leu Leu Pro Val Ala Asn Gly			
225	230	235	240
aac agc cta aac aag gtc atc cct gcc aag tct ccg ccc cca cct acc	768		
Asn Ser Leu Asn Lys Val Ile Pro Ala Lys Ser Pro Pro Pro Pro Thr			
245	250	255	
cac agc acc cag ctt gga gcc ccc agc cgc aag ccc gac ctg cga gtc	816		
His Ser Thr Gln Leu Gly Ala Pro Ser Arg Lys Pro Asp Leu Arg Val			
260	265	270	
atc act tcc cag gca gga aag ggg tta atg cat cac ttg act gag gac	864		
Ile Thr Ser Gln Ala Gly Lys Gly Leu Met His His Leu Thr Glu Asp			
275	280	285	
cat tta gat ctg aac aat gcc cag cgc ctt ggg gtc tcc cag tct act	912		
His Leu Asp Leu Asn Asn Ala Gln Arg Leu Gly Val Ser Gln Ser Thr			
290	295	300	
cat tcg ctc acc acc cca gtg gtt tct gtg gca acg ccg agt tta ctc	960		
His Ser Leu Thr Thr Pro Val Val Ser Val Ala Thr Pro Ser Leu Leu			
305	310	315	320
agc cag ggc ctc ccc ttc tct tcc atg ccc act gcc tac aac aca gat	1008		
Ser Gln Gly Leu Pro Phe Ser Ser Met Pro Thr Ala Tyr Asn Thr Asp			
325	330	335	
tac cag ttg acc agt gca gag ctc tcc tcc tta cca gcc ttt agt tca	1056		
Tyr Gln Leu Thr Ser Ala Glu Leu Ser Ser Leu Pro Ala Phe Ser Ser			
340	345	350	
cct ggg ggg ctg tcg cta ggc aat gtc act gcc tgg caa cag cca cag	1104		

Pro Gly Gly Leu Ser Leu Gly Asn Val Thr Ala Trp Gln Gln Pro Gln	
355 360 365	
cag ccc cag cag ccg cag cag cca cag cct cca cag cag cag cca ccg	1152
Gln Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Gln Pro Pro Gln Gln Gln Pro Pro	
370 375 380	
cag cca cag cag cca cag cca cag cag cct cag cag ccg caa cag cca	1200
Gln Pro Gln Gln Pro Gln Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro	
385 390 395 400	
cct cag caa cag tcc cac ctg gtc cct gta tct ctc agc aac ctc atc	1248
Pro Gln Gln Gln Ser His Leu Val Pro Val Ser Leu Ser Asn Leu Ile	
405 410 415	
ccg ggc agc ccc ctg ccc cac gtg ggt gct gcc ctc aca gtc acc acc	1296
Pro Gly Ser Pro Leu Pro His Val Gly Ala Ala Leu Thr Val Thr Thr	
420 425 430	
cac ccc cac atc agc atc aag tca gaa ccg gtg tcc cca agc cgt gag	1344
His Pro His Ile Ser Ile Lys Ser Glu Pro Val Ser Pro Ser Arg Glu	
435 440 445	
cgc agc cct gcg cct ccc cct cca gct gtg ttc cca gct gcc cgc cct	1392
Arg Ser Pro Ala Pro Pro Pro Pro Ala Val Phe Pro Ala Ala Arg Pro	
450 455 460	
gag cct ggc gat ggt ctc agc agc cca gcc ggg gga tcc tat gag acg	1440
Glu Pro Gly Asp Gly Leu Ser Ser Pro Ala Gly Gly Ser Tyr Glu Thr	
465 470 475 480	
gga gac cgg gat gac gga cgg ggg gac ttc ggg ccc aca ctg ggc ctg	1488
Gly Asp Arg Asp Asp Gly Arg Gly Asp Phe Gly Pro Thr Leu Gly Leu	
485 490 495	

ctg cgc cca gcc cca gag cct gag gct gag ggc tca gct gtg aag agg 1536

Leu Arg Pro Ala Pro Glu Pro Glu Ala Glu Gly Ser Ala Val Lys Arg

500

505

510

atg cgg ctt gat acc tgg aca tta aag

1563

Met Arg Leu Asp Thr Trp Thr Leu Lys

515

520

<210> 21

<211> 217

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 21

Met Ser Leu Val Gly Gly Phe Pro His His Pro Val Val His His Glu

1

5

10

15

Gly Tyr Pro Phe Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

20

25

30

Ser Arg Cys Ser His Glu Glu Asn Pro Tyr Phe His Gly Trp Leu Ile

35

40

45

Gly His Pro Glu Met Ser Pro Pro Asp Tyr Ser Met Ala Leu Ser Tyr

50

55

60

Ser Pro Glu Tyr Ala Ser Gly Ala Ala Gly Leu Asp His Ser His Tyr

65

70

75

80

Gly Gly Val Pro Pro Gly Ala Gly Pro Pro Gly Leu Gly Gly Pro Arg

85

90

95

Pro Val Lys Arg Arg Gly Thr Ala Asn Arg Lys Glu Arg Arg Arg Thr

100

105

110

Gln Ser Ile Asn Ser Ala Phe Ala Glu Leu Arg Glu Cys Ile Pro Asn

115	120	125	
Val Pro Ala Asp Thr Lys Leu Ser Lys Ile Lys Thr Leu Arg Leu Ala			
130	135	140	
Thr Ser Tyr Ile Ala Tyr Leu Met Asp Leu Leu Ala Lys Asp Asp Gln			
145	150	155	160
Asn Gly Glu Ala Glu Ala Phe Lys Ala Glu Ile Lys Lys Thr Asp Val			
165	170	175	
Lys Glu Glu Lys Arg Lys Lys Glu Leu Asn Glu Ile Leu Lys Ser Thr			
180	185	190	
Val Ser Ser Asn Asp Lys Lys Thr Lys Gly Arg Thr Gly Trp Pro Gln			
195	200	205	
His Val Trp Ala Leu Glu Leu Lys Gln			

210
<210> 22

<211> 651

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(654)

<400> 22

atg agt ctg gtg ggg ggc ttt ccc cac cac ccc gtg gtg cac cat gag 48

Met Ser Leu Val Gly Gly Phe Pro His His Pro Val Val His His Glu

1 5 10 15

ggc tac ccg ttc gcc gca gcc gca gcc gcc gct gct gct gcc gcc gcc 96

Gly Tyr Pro Phe Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

20	25	30	
agc cgc tgc agt cac gag gag aac ccc tat ttc cac ggc tgg ctt att			144
Ser Arg Cys Ser His Glu Glu Asn Pro Tyr Phe His Gly Trp Leu Ile			
35	40	45	
ggc cac ccg gag atg tgc ccc ccc gac tac agc atg gcc ctg tcc tac			192
Gly His Pro Glu Met Ser Pro Pro Asp Tyr Ser Met Ala Leu Ser Tyr			
50	55	60	
agt ccc gag tac gcc agc ggt gcc gcg ggc ctg gac cac tcc cat tat			240
Ser Pro Glu Tyr Ala Ser Gly Ala Ala Gly Leu Asp His Ser His Tyr			
65	70	75	80
ggg gga gtg ccg ccc ggt gcc ggg cct ccc ggc ctg ggg ggg ccg cgc			288
Gly Gly Val Pro Pro Gly Ala Gly Pro Pro Gly Leu Gly Gly Pro Arg			
85	90	95	
ccg gtg aag cgt cgg ggc acc gcc aac cgc aag gag cgg cgc agg act			336
Pro Val Lys Arg Arg Gly Thr Ala Asn Arg Lys Glu Arg Arg Arg Thr			
100	105	110	
cag agc atc aac agc gcc ttc gcc gag ctg cgc gag tgc atc ccc aac			384
Gln Ser Ile Asn Ser Ala Phe Ala Glu Leu Arg Glu Cys Ile Pro Asn			
115	120	125	
gtg ccc gcc gac acc aaa ctc tcc aaa atc aag act ctg cgc ctg gcc			432
Val Pro Ala Asp Thr Lys Leu Ser Lys Ile Lys Thr Leu Arg Leu Ala			
130	135	140	
acc agc tac atc gcc tac ctc atg gat ctg ctg gcc aag gac gac cag			480
Thr Ser Tyr Ile Ala Tyr Leu Met Asp Leu Leu Ala Lys Asp Asp Gln			
145	150	155	160
aac gga gag gcg gag gcc ttc aag gcg gag atc aag aag acc gac gtg			528

Asn Gly Glu Ala Glu Ala Phe Lys Ala Glu Ile Lys Lys Thr Asp Val
 165 170 175
 aaa gag gag aag agg aag aaa gag ctg aat gaa atc ttg aaa agt aca 576
 Lys Glu Glu Lys Arg Lys Lys Glu Leu Asn Glu Ile Leu Lys Ser Thr
 180 185 190
 gtg agc agc aac gac aag aaa acc aaa ggc cgg aca ggc tgg cca cag 624
 Val Ser Ser Asn Asp Lys Lys Thr Lys Gly Arg Thr Gly Trp Pro Gln
 195 200 205
 cac gtc tgg gcc ctg gag ctc aag cag 651
 His Val Trp Ala Leu Glu Leu Lys Gln
 210 215
 <210> 23
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 Met Asn Leu Val Gly Ser Tyr Ala His His His His His His His Pro
 1 5 10 15
 His Pro Ala His Pro Met Leu His Glu Pro Phe Leu Phe Gly Pro Ala
 20 25 30
 Ser Arg Cys His Gln Glu Arg Pro Tyr Phe Gln Ser Trp Leu Leu Ser
 35 40 45
 Pro Ala Asp Ala Ala Pro Asp Phe Pro Ala Gly Gly Pro Pro Pro Ala
 50 55 60
 Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Tyr Gly Pro Asp Ala Arg Pro Gly Gln
 65 70 75 80

Ser Pro Gly Arg Leu Glu Ala Leu Gly Gly Arg Leu Gly Arg Arg Lys

85

90

95

Gly Ser Gly Pro Lys Lys Glu Arg Arg Arg Thr Glu Ser Ile Asn Ser

100

105

110

Ala Phe Ala Glu Leu Arg Glu Cys Ile Pro Asn Val Pro Ala Asp Thr

115

120

125

Lys Leu Ser Lys Ile Lys Thr Leu Arg Leu Ala Thr Ser Tyr Ile Ala

130

135

140

Tyr Leu Met Asp Val Leu Ala Lys Asp Ala Gln Ser Gly Asp Pro Glu

145

150

155

160

Ala Phe Lys Ala Glu Leu Lys Lys Ala Asp Gly Gly Arg Glu Ser Lys

165

170

175

Arg Lys Arg Glu Leu Gln Gln His Glu Gly Phe Pro Pro Ala Leu Gly

180

185

190

Pro Val Glu Lys Arg Ile Lys Gly Arg Thr Gly Trp Pro Gln Gln Val

195

200

205

Trp Ala Leu Glu Leu Asn Gln

210

<210> 24

<211> 645

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(648)

<400> 24

atg aac ctc gtg ggc agc tac gca cac cat cac cac cat cac cac ccg	48
Met Asn Leu Val Gly Ser Tyr Ala His His His His His His His Pro	
1 5 10 15	
cac cct gcg cac ccc atg ctc cac gaa ccc ttc ctc ttc ggt ccg gcc	96
His Pro Ala His Pro Met Leu His Glu Pro Phe Leu Phe Gly Pro Ala	
20 25 30	
tcg cgc tgt cat cag gaa agg ccc tac ttc cag agc tgg ctg ctg agc	144
Ser Arg Cys His Gln Glu Arg Pro Tyr Phe Gln Ser Trp Leu Leu Ser	
35 40 45	
ccg gct gac gct gcc ccg gac ttc cct gcg ggc ggg ccg ccg ccc gcg	192
Pro Ala Asp Ala Ala Pro Asp Phe Pro Ala Gly Gly Pro Pro Pro Ala	
50 55 60	
gcc gct gca gcc gcc acc gcc tat ggt cct gac gcc agg cct ggg cag	240
Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Tyr Gly Pro Asp Ala Arg Pro Gly Gln	
65 70 75 80	
agc ccc ggg cgg ctg gag gcg ctt ggc ggc cgt ctt ggc cgg cgg aaa	288
Ser Pro Gly Arg Leu Glu Ala Leu Gly Gly Arg Leu Gly Arg Arg Lys	
85 90 95	
ggc tca gga ccc aag aag gag cgg aga cgc act gag agc att aac agc	336
Gly Ser Gly Pro Lys Lys Glu Arg Arg Arg Thr Glu Ser Ile Asn Ser	
100 105 110	
gca ttc gcg gag ttg cgc gag tgc atc ccc aac gtg ccg gcc gac acc	384
Ala Phe Ala Glu Leu Arg Glu Cys Ile Pro Asn Val Pro Ala Asp Thr	
115 120 125	
aag ctc tcc aag atc aag act ctg cgc cta gcc acc agc tac atc gcc	432
Lys Leu Ser Lys Ile Lys Thr Leu Arg Leu Ala Thr Ser Tyr Ile Ala	

130	135	140	
tac ctg atg gac gtg ctg gcc aag gat gca cag tct ggc gat ccc gag			480
Tyr Leu Met Asp Val Leu Ala Lys Asp Ala Gln Ser Gly Asp Pro Glu			
145	150	155	160
gcc ttc aag gct gaa ctc aag aag gcg gat ggc ggc cgt gag agc aag			528
Ala Phe Lys Ala Glu Leu Lys Lys Ala Asp Gly Gly Arg Glu Ser Lys			
	165	170	175
cgg aaa agg gag ctg cag cag cac gaa ggt ttt cct cct gcc ctg ggc			576
Arg Lys Arg Glu Leu Gln Gln His Glu Gly Phe Pro Pro Ala Leu Gly			
	180	185	190
cca gtc gag aag agg att aaa gga cgc acc ggc tgg ccg cag caa gtc			624
Pro Val Glu Lys Arg Ile Lys Gly Arg Thr Gly Trp Pro Gln Gln Val			
	195	200	205
tgg gcg ctg gag tta aac cag			645
Trp Ala Leu Glu Leu Asn Gln			
	210	215	
<210> 25			
<211> 411			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 25			
Met Glu Arg Met Ser Asp Ser Ala Asp Lys Pro Ile Asp Asn Asp Ala			
1	5	10	15
Glu Gly Val Trp Ser Pro Asp Ile Glu Gln Ser Phe Gln Glu Ala Leu			
	20	25	30
Ala Ile Tyr Pro Pro Cys Gly Arg Arg Lys Ile Ile Leu Ser Asp Glu			

35	40	45
Gly Lys Met Tyr Gly Arg Asn Glu Leu Ile Ala Arg Tyr Ile Lys Leu		
50	55	60
Arg Thr Gly Lys Thr Arg Thr Arg Lys Gln Val Ser Ser His Ile Gln		
65	70	75
Val Leu Ala Arg Arg Lys Ser Arg Asp Phe His Ser Lys Leu Lys Asp		
85	90	95
Gln Thr Ala Lys Asp Lys Ala Leu Gln His Met Ala Ala Met Ser Ser		
100	105	110
Ala Gln Ile Val Ser Ala Thr Ala Ile His Asn Lys Leu Gly Leu Pro		
115	120	125
Gly Ile Pro Arg Pro Thr Phe Pro Gly Ala Pro Gly Phe Trp Pro Gly		
130	135	140
Met Ile Gln Thr Gly Gln Pro Gly Ser Ser Gln Asp Val Lys Pro Phe		
145	150	155
Val Gln Gln Ala Tyr Pro Ile Gln Pro Ala Val Thr Ala Pro Ile Pro		
165	170	175
Gly Phe Glu Pro Ala Ser Ala Pro Ala Pro Ser Val Pro Ala Trp Gln		
180	185	190
Gly Arg Ser Ile Gly Thr Thr Lys Leu Arg Leu Val Glu Phe Ser Ala		
195	200	205
Phe Leu Glu Gln Gln Arg Asp Pro Asp Ser Tyr Asn Lys His Leu Phe		
210	215	220
Val His Ile Gly His Ala Asn His Ser Tyr Ser Asp Pro Leu Leu Glu		
225	230	235
Ser Val Asp Ile Arg Gln Ile Tyr Asp Lys Phe Pro Glu Lys Lys Gly		240

245	250	255
Gly Leu Lys Glu Leu Phe Gly Lys Gly Pro Gln Asn Ala Phe Phe Leu		
260	265	270
Val Lys Phe Trp Ala Asp Leu Asn Cys Asn Ile Gln Asp Asp Ala Gly		
275	280	285
Ala Phe Tyr Gly Val Thr Ser Gln Tyr Glu Ser Ser Glu Asn Met Thr		
290	295	300
Val Thr Cys Ser Thr Lys Val Cys Ser Phe Gly Lys Gln Val Val Glu		
305	310	315
Lys Val Glu Thr Glu Tyr Ala Arg Phe Glu Asn Gly Arg Phe Val Tyr		
325	330	335
Arg Ile Asn Arg Ser Pro Met Cys Glu Tyr Met Ile Asn Phe Ile His		
340	345	350
Lys Leu Lys His Leu Pro Glu Lys Tyr Met Met Asn Ser Val Leu Glu		
355	360	365
Asn Phe Thr Ile Leu Leu Val Val Thr Asn Arg Asp Thr Gln Glu Thr		
370	375	380
Leu Leu Cys Met Ala Cys Val Phe Glu Val Ser Asn Ser Glu His Gly		
385	390	395
Ala Gln His His Ile Tyr Arg Leu Val Lys Asp		
405	410	

<210> 26

<211> 1233

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(1236)

<400> 26

atg gaa agg atg agt gac tct gca gat aag cca att gac aat gat gca	48
Met Glu Arg Met Ser Asp Ser Ala Asp Lys Pro Ile Asp Asn Asp Ala	
1 5 10 15	
gaa ggg gtc tgg agc ccc gac atc gag caa agc ttt cag gag gcc ctg	96
Glu Gly Val Trp Ser Pro Asp Ile Glu Gln Ser Phe Gln Glu Ala Leu	
20 25 30	
gct atc tat cca cca tgt ggg agg agg aaa atc atc tta tca gac gaa	144
Ala Ile Tyr Pro Pro Cys Gly Arg Arg Lys Ile Ile Leu Ser Asp Glu	
35 40 45	
ggc aaa atg tat ggt agg aat gaa ttg ata gcc aga tac atc aaa ctc	192
Gly Lys Met Tyr Gly Arg Asn Glu Leu Ile Ala Arg Tyr Ile Lys Leu	
50 55 60	
agg aca ggc aag acg agg acc aga aaa cag gtg tct agt cac att cag	240
Arg Thr Gly Lys Thr Arg Thr Arg Lys Gln Val Ser Ser His Ile Gln	
65 70 75 80	
gtt ctt gcc aga agg aaa tct cgt gat ttt cat tcc aag cta aag gat	288
Val Leu Ala Arg Arg Lys Ser Arg Asp Phe His Ser Lys Leu Lys Asp	
85 90 95	
cag act gca aag gat aag gcc ctg cag cac atg gcg gcc atg tcc tca	336
Gln Thr Ala Lys Asp Lys Ala Leu Gln His Met Ala Ala Met Ser Ser	
100 105 110	
gcc cag atc gtc tcg gcc act gcc att cat aac aag ctg ggg ctg cct	384
Ala Gln Ile Val Ser Ala Thr Ala Ile His Asn Lys Leu Gly Leu Pro	

115	120	125	
ggg att cca cgc ccg acc ttc cca ggg gcg ccg ggg ttc tgg ccg gga	432		
Gly Ile Pro Arg Pro Thr Phe Pro Gly Ala Pro Gly Phe Trp Pro Gly			
130	135	140	
atg att caa aca ggg cag cca gga tcc tca caa gac gtc aag cct ttt	480		
Met Ile Gln Thr Gly Gln Pro Gly Ser Ser Gln Asp Val Lys Pro Phe			
145	150	155	160
gtg cag cag gcc tac ccc atc cag cca gcg gtc aca gcc ccc att cca	528		
Val Gln Gln Ala Tyr Pro Ile Gln Pro Ala Val Thr Ala Pro Ile Pro			
	165	170	175
ggg ttt gag cct gca tcg gcc cca gct ccc tca gtc cct gcc tgg caa	576		
Gly Phe Glu Pro Ala Ser Ala Pro Ala Pro Ser Val Pro Ala Trp Gln			
	180	185	190
ggt cgc tcc att ggc aca acc aag ctt cgc ctg gtg gaa ttt tca gct	624		
Gly Arg Ser Ile Gly Thr Thr Lys Leu Arg Leu Val Glu Phe Ser Ala			
	195	200	205
ttt ctc gag cag cag cga gac cca gac tcg tac aac aaa cac ctc ttc	672		
Phe Leu Glu Gln Gln Arg Asp Pro Asp Ser Tyr Asn Lys His Leu Phe			
	210	215	220
gtg cac att ggg cat gcc aac cat tct tac agt gac cca ttg ctt gaa	720		
Val His Ile Gly His Ala Asn His Ser Tyr Ser Asp Pro Leu Leu Glu			
225	230	235	240
tca gtg gac att cgt cag att tat gac aaa ttt cct gaa aag aaa ggt	768		
Ser Val Asp Ile Arg Gln Ile Tyr Asp Lys Phe Pro Glu Lys Lys Gly			
	245	250	255
ggc tta aag gaa ctg ttt gga aag ggc cct caa aat gcc ttc ttc ctc	816		

Gly Leu Lys Glu Leu Phe Gly Lys Gly Pro Gln Asn Ala Phe Phe Leu	
260	265
270	
gta aaa ttc tgg gct gat tta aac tgc aat att caa gat gat gct ggg	864
Val Lys Phe Trp Ala Asp Leu Asn Cys Asn Ile Gln Asp Asp Ala Gly	
275	280
285	
gct ttt tat ggt gta acc agt cag tac gag agt tct gaa aat atg aca	912
Ala Phe Tyr Gly Val Thr Ser Gln Tyr Glu Ser Ser Glu Asn Met Thr	
290	295
300	
gtc acc tgt tcc acc aaa gtt tgc tcc ttt ggg aag caa gta gta gaa	960
Val Thr Cys Ser Thr Lys Val Cys Ser Phe Gly Lys Gln Val Val Glu	
305	310
315	320
aaa gta gag acg gag tat gca agg ttt gag aat ggc cga ttt gta tac	1008
Lys Val Glu Thr Glu Tyr Ala Arg Phe Glu Asn Gly Arg Phe Val Tyr	
325	330
335	
cga ata aac cgc tcc cca atg tgt gaa tat atg atc aac ttc atc cac	1056
Arg Ile Asn Arg Ser Pro Met Cys Glu Tyr Met Ile Asn Phe Ile His	
340	345
350	
aag ctc aaa cac tta cca gag aaa tat atg atg aac agt gtt ttg gaa	1104
Lys Leu Lys His Leu Pro Glu Lys Tyr Met Met Asn Ser Val Leu Glu	
355	360
365	
aac ttc aca att tta ttg gtg gta aca aac agg gat aca caa gaa act	1152
Asn Phe Thr Ile Leu Leu Val Val Thr Asn Arg Asp Thr Gln Glu Thr	
370	375
380	
cta ctc tgc atg gcc tgt gtg ttt gaa gtt tca aat agt gaa cac gga	1200
Leu Leu Cys Met Ala Cys Val Phe Glu Val Ser Asn Ser Glu His Gly	
385	390
395	400

gca caa cat cat att tac agg ctt gta aag gac

1233

Ala Gln His His Ile Tyr Arg Leu Val Lys Asp

405

410

<210> 27

<211> 427

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Ile Thr Ser Asn Glu Trp Ser Ser Pro Thr Ser Pro Glu Gly Ser Thr

1

5

10

15

Ala Ser Gly Gly Ser Gln Ala Leu Asp Lys Pro Ile Asp Asn Asp Ala

20

25

30

Glu Gly Val Trp Ser Pro Asp Ile Glu Gln Ser Phe Gln Glu Ala Leu

35

40

45

Ala Ile Tyr Pro Pro Cys Gly Arg Arg Lys Ile Ile Leu Ser Asp Glu

50

55

60

Gly Lys Met Tyr Gly Arg Asn Glu Leu Ile Ala Arg Tyr Ile Lys Leu

65

70

75

80

Arg Thr Gly Lys Thr Arg Thr Arg Lys Gln Val Ser Ser His Ile Gln

85

90

95

Val Leu Ala Arg Arg Lys Ala Arg Glu Ile Gln Ala Lys Leu Lys Asp

100

105

110

Gln Ala Ala Lys Asp Lys Ala Leu Gln Ser Met Ala Ala Met Ser Ser

115

120

125

Ala Gln Ile Ile Ser Ala Thr Ala Phe His Ser Ser Met Ala Leu Ala

130

135

140

Arg Gly Pro Gly Arg Pro Ala Val Ser Gly Phe Trp Gln Gly Ala Leu			
145	150	155	160
Pro Gly Gln Ala Gly Thr Ser His Asp Val Lys Pro Phe Ser Gln Gln			
	165	170	175
Thr Tyr Ala Val Gln Pro Pro Leu Pro Leu Pro Gly Phe Glu Ser Pro			
180	185	190	
Ala Gly Pro Ala Pro Ser Pro Ser Ala Pro Pro Ala Pro Pro Trp Gln			
195	200	205	
Gly Arg Ser Val Ala Ser Ser Lys Leu Trp Met Leu Glu Phe Ser Ala			
210	215	220	
Phe Leu Glu Gln Gln Gln Asp Pro Asp Thr Tyr Asn Lys His Leu Phe			
225	230	235	240
Val His Ile Gly Gln Ser Ser Pro Ser Tyr Ser Asp Pro Tyr Leu Glu			
	245	250	255
Ala Val Asp Ile Arg Gln Ile Tyr Asp Lys Phe Pro Glu Lys Lys Gly			
	260	265	270
Gly Leu Lys Asp Leu Phe Glu Arg Gly Pro Ser Asn Ala Phe Phe Leu			
275	280	285	
Val Lys Phe Trp Ala Asp Leu Asn Thr Asn Ile Glu Asp Glu Gly Ser			
290	295	300	
Ser Phe Tyr Gly Val Ser Ser Gln Tyr Glu Ser Pro Glu Asn Met Ile			
305	310	315	320
Ile Thr Cys Ser Thr Lys Val Cys Ser Phe Gly Lys Gln Val Val Glu			
	325	330	335
Lys Val Glu Thr Glu Tyr Ala Arg Tyr Glu Asn Gly His Tyr Ser Tyr			
340	345	350	

Arg Ile His Arg Ser Pro Leu Cys Glu Tyr Met Ile Asn Phe Ile His

355

360

365

Lys Leu Lys His Leu Pro Glu Lys Tyr Met Met Asn Ser Val Leu Glu

370

375

380

Asn Phe Thr Ile Leu Gln Val Val Thr Asn Arg Asp Thr Gln Glu Thr

385

390

395

400

Leu Leu Cys Ile Ala Tyr Val Phe Glu Val Ser Ala Ser Glu His Gly

405

410

415

Ala Gln His His Ile Tyr Arg Leu Val Lys Glu

420

425

<210> 28

<211> 1281

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(1284)

<400> 28

att acc tcc aac gag tgg agc tct ccc acc tcc cct gag ggg agc acc 48

Ile Thr Ser Asn Glu Trp Ser Ser Pro Thr Ser Pro Glu Gly Ser Thr

1

5

10

15

gcc tct ggg ggc agt cag gca ctg gac aag ccc atc gac aat gac gca 96

Ala Ser Gly Gly Ser Gln Ala Leu Asp Lys Pro Ile Asp Asn Asp Ala

20

25

30

gag ggc gtg tgg agc ccg gat att gag cag agt ttc cag gag gcc ctc 144

Glu Gly Val Trp Ser Pro Asp Ile Glu Gln Ser Phe Gln Glu Ala Leu

35	40	45	
gcc atc tac ccg ccc tgt ggc agg cgc aaa atc atc ctg tgc gac gag	192		
Ala Ile Tyr Pro Pro Cys Gly Arg Arg Lys Ile Ile Leu Ser Asp Glu			
50	55	60	
ggc aag atg tat ggt cgg aac gag ctg att gcc cgc tac atc aag ctc	240		
Gly Lys Met Tyr Gly Arg Asn Glu Leu Ile Ala Arg Tyr Ile Lys Leu			
65	70	75	80
cgg aca ggg aag acc cgc acc agg aag cag gtc tcc agc cac atc cag	288		
Arg Thr Gly Lys Thr Arg Thr Arg Lys Gln Val Ser Ser His Ile Gln			
85	90	95	
gtg ctg gct cgt cgc aaa gct cgc gag atc cag gcc aag cta aag gac	336		
Val Leu Ala Arg Arg Lys Ala Arg Glu Ile Gln Ala Lys Leu Lys Asp			
100	105	110	
cag gca gct aag gac aag gcc ctg cag agc atg gct gcc atg tgc tct	384		
Gln Ala Ala Lys Asp Lys Ala Leu Gln Ser Met Ala Ala Met Ser Ser			
115	120	125	
gca cag atc atc tcc gcc acg gcc ttc cac agt agc atg gcc ctc gcc	432		
Ala Gln Ile Ile Ser Ala Thr Ala Phe His Ser Ser Met Ala Leu Ala			
130	135	140	
cgg ggc ccc ggc cgc cca gca gtc tca ggg ttt tgg caa gga gct ttg	480		
Arg Gly Pro Gly Arg Pro Ala Val Ser Gly Phe Trp Gln Gly Ala Leu			
145	150	155	160
cca ggc caa gcc gga acg tcc cat gat gtg aag cct ttc tct cag caa	528		
Pro Gly Gln Ala Gly Thr Ser His Asp Val Lys Pro Phe Ser Gln Gln			
165	170	175	
acc tat gct gtc cag cct ccg ctg cct ctg cca ggg ttt gag tct cct	576		

Thr Tyr Ala Val Gln Pro Pro Leu Pro Leu Pro Gly Phe Glu Ser Pro	
180 185 190	
gca ggg ccc gcc cca tgc ccc tct gcg ccc ccg gca ccc cca tgg cag	624
Ala Gly Pro Ala Pro Ser Pro Ser Ala Pro Pro Ala Pro Pro Trp Gln	
195 200 205	
ggc cgc agc gtg gcc agc tcc aag ctc tgg atg ttg gag ttc tct gcc	672
Gly Arg Ser Val Ala Ser Ser Lys Leu Trp Met Leu Glu Phe Ser Ala	
210 215 220	
ttc ctg gag cag cag cag gac ccg gac acg tac aac aag cac ctg ttc	720
Phe Leu Glu Gln Gln Gln Asp Pro Asp Thr Tyr Asn Lys His Leu Phe	
225 230 235 240	
gtg cac att ggc cag tcc agc cca agc tac agc gac ccc tac ctc gaa	768
Val His Ile Gly Gln Ser Ser Pro Ser Tyr Ser Asp Pro Tyr Leu Glu	
245 250 255	
gcc gtg gac atc cgc caa atc tat gac aaa ttc ccg gag aaa aag ggt	816
Ala Val Asp Ile Arg Gln Ile Tyr Asp Lys Phe Pro Glu Lys Lys Gly	
260 265 270	
gga ctc aag gat ctc ttc gaa cgg gga ccc tcc aat gcc ttt ttt ctt	864
Gly Leu Lys Asp Leu Phe Glu Arg Gly Pro Ser Asn Ala Phe Phe Leu	
275 280 285	
gtg aag ttc tgg gca gac ctc aac acc aac atc gag gat gaa ggc agc	912
Val Lys Phe Trp Ala Asp Leu Asn Thr Asn Ile Glu Asp Glu Gly Ser	
290 295 300	
tcc ttc tat ggg gtc tcc agc cag tat gag agc ccc gag aac atg atc	960
Ser Phe Tyr Gly Val Ser Ser Gln Tyr Glu Ser Pro Glu Asn Met Ile	
305 310 315 320	

atc acc tgc tcc acg aag gtc tgc tct ttc ggc aag cag gtg gtg gag	1008
Ile Thr Cys Ser Thr Lys Val Cys Ser Phe Gly Lys Gln Val Val Glu	
325 330 335	
aaa gtt gag aca gag tat gct cgc tat gag aat gga cac tac tct tac	1056
Lys Val Glu Thr Glu Tyr Ala Arg Tyr Glu Asn Gly His Tyr Ser Tyr	
340 345 350	
cgc atc cac cgg tcc ccg ctc tgt gag tac atg atc aac ttc atc cac	1104
Arg Ile His Arg Ser Pro Leu Cys Glu Tyr Met Ile Asn Phe Ile His	
355 360 365	
aag ctc aag cac ctc cct gag aag tac atg atg aac agc gtg ctg gag	1152
Lys Leu Lys His Leu Pro Glu Lys Tyr Met Met Asn Ser Val Leu Glu	
370 375 380	
aac ttc acc atc ctg cag gtg gtc acc aac aga gac aca cag gag acc	1200
Asn Phe Thr Ile Leu Gln Val Val Thr Asn Arg Asp Thr Gln Glu Thr	
385 390 395 400	
ttg ctg tgc att gcc tat gtc ttt gag gtg tca gcc agt gag cac ggg	1248
Leu Leu Cys Ile Ala Tyr Val Phe Glu Val Ser Ala Ser Glu His Gly	
405 410 415	
gct cag cac cac atc tac agg ctg gtg aaa gaa	1281
Ala Gln His His Ile Tyr Arg Leu Val Lys Glu	
420 425	

<210> 29

<211> 435

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Ile	Ala	Ser	Asn	Ser	Trp	Asn	Ala	Ser	Ser	Ser	Pro	Gly	Glu	Ala	Arg
1				5					10					15	
Glu	Asp	Gly	Pro	Glu	Gly	Leu	Asp	Lys	Gly	Leu	Asp	Asn	Asp	Ala	Glu
			20					25					30		
Gly	Val	Trp	Ser	Pro	Asp	Ile	Glu	Gln	Ser	Phe	Gln	Glu	Ala	Leu	Ala
/	35					40						45			
Ile	Tyr	Pro	Pro	Cys	Gly	Arg	Arg	Lys	Ile	Ile	Leu	Ser	Asp	Glu	Gly
	50					55					60				
Lys	Met	Tyr	Gly	Arg	Asn	Glu	Leu	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Lys	Leu	Arg
65					70					75				80	
Thr	Gly	Lys	Thr	Arg	Thr	Arg	Lys	Gln	Val	Ser	Ser	His	Ile	Gln	Val
				85					90					95	
Leu	Ala	Arg	Lys	Lys	Val	Arg	Glu	Tyr	Gln	Val	Gly	Ile	Lys	Ala	Met
			100						105					110	
Asn	Leu	Asp	Gln	Val	Ser	Lys	Asp	Lys	Ala	Leu	Gln	Ser	Met	Ala	Ser
			115					120					125		
Met	Ser	Ser	Ala	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Ser	Val	Leu	Gln	Asn	Lys	Phe
	130					135					140				
Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Leu	Pro	Gln	Ala	Val	Phe	Ser	Thr	Ser	Ser	Arg
145					150					155					160
Phe	Trp	Ser	Ser	Pro	Pro	Leu	Leu	Gly	Gln	Gln	Pro	Gly	Pro	Ser	Gln
				165					170					175	
Asp	Ile	Lys	Pro	Phe	Ala	Gln	Pro	Ala	Tyr	Pro	Ile	Gln	Pro	Pro	Leu
		180						185					190		
Pro	Pro	Thr	Leu	Ser	Ser	Tyr	Glu	Pro	Leu	Ala	Pro	Leu	Pro	Ser	Ala
		195						200					205		

Ala Ala Ser Val Pro Val Trp Gln Asp Arg Thr Ile Ala Ser Ser Arg			
210	215	220	
Leu Arg Leu Leu Glu Tyr Ser Ala Phe Met Glu Val Gln Arg Asp Pro			
225	230	235	240
Asp Thr Tyr Ser Lys His Leu Phe Val His Ile Gly Gln Thr Asn Pro			
245	250	255	
Ala Phe Ser Asp Pro Pro Leu Glu Ala Val Asp Val Arg Gln Ile Tyr			
260	265	270	
Asp Lys Phe Pro Glu Lys Lys Gly Gly Leu Lys Glu Leu Tyr Glu Lys			
275	280	285	
Gly Pro Pro Asn Ala Phe Phe Leu Val Lys Phe Trp Ala Asp Leu Asn			
290	295	300	
Ser Thr Ile Gln Glu Gly Pro Gly Ala Phe Tyr Gly Val Ser Ser Gln			
305	310	315	320
Tyr Ser Ser Ala Asp Ser Met Thr Ile Ser Val Ser Thr Lys Val Cys			
325	330	335	
Ser Phe Gly Lys Gln Val Val Glu Lys Val Glu Thr Glu Tyr Ala Arg			
340	345	350	
Leu Glu Asn Gly Arg Phe Val Tyr Arg Ile His Arg Ser Pro Met Cys			
355	360	365	
Glu Tyr Met Ile Asn Phe Ile His Lys Leu Lys His Leu Pro Glu Lys			
370	375	380	
Tyr Met Met Asn Ser Val Leu Glu Asn Phe Thr Ile Leu Gln Val Val			
385	390	395	400
Thr Ser Arg Asp Ser Gln Glu Thr Leu Leu Val Ile Ala Phe Val Phe			
405	410	415	

Glu Val Ser Thr Ser Glu His Gly Ala Gln His His Val Tyr Lys Leu

420

425

430

Val Lys Asp

<210> 30

<211> 1305

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(1305)

<400> 30

ata gcg tcc aac agc tgg aac gcc agc agc agc ccc ggg gag gcc cgg 48

Ile Ala Ser Asn Ser Trp Asn Ala Ser Ser Ser Pro Gly Glu Ala Arg

1

5

10

15

gag gat ggg ccc gag ggc ctg gac aag ggg ctg gac aac gat gcg gag 96

Glu Asp Gly Pro Glu Gly Leu Asp Lys Gly Leu Asp Asn Asp Ala Glu

20

25

30

ggc gtg tgg agc ccg gac atc gag cag agc ttc cag gag gcc ctg gcc 144

Gly Val Trp Ser Pro Asp Ile Glu Gln Ser Phe Gln Glu Ala Leu Ala

35

40

45

atc tac ccg ccc tgc ggc cgg cgg aag atc atc ctg tca gac gag ggc 192

Ile Tyr Pro Pro Cys Gly Arg Arg Lys Ile Ile Leu Ser Asp Glu Gly

50

55

60

aag atg tac ggc cga aat gag ttg att gca cgc tat att aaa ctg agg 240

Lys Met Tyr Gly Arg Asn Glu Leu Ile Ala Arg Tyr Ile Lys Leu Arg

65

70

75

80

acg ggg aag act cgg acg aga aaa cag gtg tcc agc cac ata cag gtt	288
Thr Gly Lys Thr Arg Thr Arg Lys Gln Val Ser Ser His Ile Gln Val	
85 90 95	
cta gct cgg aag aag gtg cgg gag tac cag gtt ggc atc aag gcc atg	336
Leu Ala Arg Lys Lys Val Arg Glu Tyr Gln Val Gly Ile Lys Ala Met	
100 105 110	
aac ctg gac cag gtc tcc aag gac aaa gcc ctt cag agc atg gcg tcc	384
Asn Leu Asp Gln Val Ser Lys Asp Lys Ala Leu Gln Ser Met Ala Ser	
115 120 125	
atg tcc tct gcc cag atc gtc tct gcc agt gtc ctg cag aac aag ttc	432
Met Ser Ser Ala Gln Ile Val Ser Ala Ser Val Leu Gln Asn Lys Phe	
130 135 140	
agc cca cct tcc cct ctg ccc cag gcc gtc ttc tcc act tcc tcg cgg	480
Ser Pro Pro Ser Pro Leu Pro Gln Ala Val Phe Ser Thr Ser Ser Arg	
145 150 155 160	
ttc tgg agc agc ccc cct ctc ctg gga cag cag cct gga ccc tct cag	528
Phe Trp Ser Ser Pro Pro Leu Leu Gly Gln Gln Pro Gly Pro Ser Gln	
165 170 175	
gac atc aag ccc ttt gca cag cca gcc tac ccc atc cag ccg ccc ctg	576
Asp Ile Lys Pro Phe Ala Gln Pro Ala Tyr Pro Ile Gln Pro Pro Leu	
180 185 190	
ccg ccg acg ctc agc agt tat gag ccc ctg gcc ccg ctc ccc tca gct	624
Pro Pro Thr Leu Ser Ser Tyr Glu Pro Leu Ala Pro Leu Pro Ser Ala	
195 200 205	
gct gcc tct gtg cct gtg tgg cag gac cgt acc att gcc tcc tcc cgg	672
Ala Ala Ser Val Pro Val Trp Gln Asp Arg Thr Ile Ala Ser Ser Arg	

210	215	220	
ctg cgg ctc ctg gag tat tca gcc ttc atg gag gtg cag cga gac cct			720
Leu Arg Leu Leu Glu Tyr Ser Ala Phe Met Glu Val Gln Arg Asp Pro			
225	230	235	240
gac acg tac agc aaa cac ctg ttt gtg cac atc ggc cag acg aac ccc			768
Asp Thr Tyr Ser Lys His Leu Phe Val His Ile Gly Gln Thr Asn Pro			
245	250	255	
gcc ttc tca gac cca ccc ctg gag gca gta gat gtg cgc cag atc tat			816
Ala Phe Ser Asp Pro Pro Leu Glu Ala Val Asp Val Arg Gln Ile Tyr			
260	265	270	
gac aaa ttc ccc gag aaa aag gga gga ttg aag gag ctc tat gag aag			864
Asp Lys Phe Pro Glu Lys Lys Gly Gly Leu Lys Glu Leu Tyr Glu Lys			
275	280	285	
ggg ccc cct aat gcc ttc ttc ctt gtc aag ttc tgg gcc gac ctc aac			912
Gly Pro Pro Asn Ala Phe Phe Leu Val Lys Phe Trp Ala Asp Leu Asn			
290	295	300	
agc acc atc cag gag ggc ccg gga gcc ttc tat ggg gtc agc tct cag			960
Ser Thr Ile Gln Glu Gly Pro Gly Ala Phe Tyr Gly Val Ser Ser Gln			
305	310	315	320
tac agc tct gct gat agc atg acc atc agc gtc tcc acc aag gtg tgc			1008
Tyr Ser Ser Ala Asp Ser Met Thr Ile Ser Val Ser Thr Lys Val Cys			
325	330	335	
tcc ttt ggc aaa cag gtg gta gag aag gtg gag act gag tat gcc agg			1056
Ser Phe Gly Lys Gln Val Val Glu Lys Val Glu Thr Glu Tyr Ala Arg			
340	345	350	
ctg gag aac ggg cgc ttt gtg tac cgt atc cac cgc tgc ccc atg tgc			1104

Leu Glu Asn Gly Arg Phe Val Tyr Arg Ile His Arg Ser Pro Met Cys
 355 360 365
 gag tac atg atc aac ttc atc cac aag ctg aag cac ctg ccc gag aag 1152
 Glu Tyr Met Ile Asn Phe Ile His Lys Leu Lys His Leu Pro Glu Lys
 370 375 380
 tac atg atg aac agc gtg ctg gag aac ttc acc atc ctg cag gtg gtc 1200
 Tyr Met Met Asn Ser Val Leu Glu Asn Phe Thr Ile Leu Gln Val Val
 385 390 395 400
 acg agc cgg gac tcc cag gag acc ttg ctt gtc att gct ttt gtc ttc 1248
 Thr Ser Arg Asp Ser Gln Glu Thr Leu Leu Val Ile Ala Phe Val Phe
 405 410 415
 gaa gtc tcc acc agt gag cac ggg gcc cag cac cat gtc tac aag ctc 1296
 Glu Val Ser Thr Ser Glu His Gly Ala Gln His His Val Tyr Lys Leu
 420 425 430
 gtc aaa gac 1305
 Val Lys Asp
 435
 <210> 31
 <211> 1132
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 31
 Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser
 1 5 10 15
 His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly
 20 25 30

Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp			
245	250	255	
Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val			
260	265	270	
Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala			
275	280	285	
Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His			
290	295	300	
Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro			
305	310	315	320
Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly			
325	330	335	
Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro			
340	345	350	
Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser			
355	360	365	
Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln			
370	375	380	
Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His			
385	390	395	400
Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg			
405	410	415	
Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln			
420	425	430	
Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu			
435	440	445	

Val	Gln	Leu	Leu	Arg	Gln	His	Ser	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Tyr	Gly	Phe
450							455								460
Val	Arg	Ala	Cys	Leu	Arg	Arg	Leu	Val	Pro	Pro	Gly	Leu	Trp	Gly	Ser
465							470								480
Arg	His	Asn	Glu	Arg	Arg	Phe	Leu	Arg	Asn	Thr	Lys	Lys	Phe	Ile	Ser
							485								495
Leu	Gly	Lys	His	Ala	Lys	Leu	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Thr	Trp	Lys	Met
							500								510
Ser	Val	Arg	Asp	Cys	Ala	Trp	Leu	Arg	Arg	Ser	Pro	Gly	Val	Gly	Cys
							515								525
Val	Pro	Ala	Ala	Glu	His	Arg	Leu	Arg	Glu	Glu	Ile	Leu	Ala	Lys	Phe
							530								540
Leu	His	Trp	Leu	Met	Ser	Val	Tyr	Val	Val	Glu	Leu	Leu	Arg	Ser	Phe
545							550								560
Phe	Tyr	Val	Thr	Glu	Thr	Thr	Phe	Gln	Lys	Asn	Arg	Leu	Phe	Phe	Tyr
							565								575
Arg	Lys	Ser	Val	Trp	Ser	Lys	Leu	Gln	Ser	Ile	Gly	Ile	Arg	Gln	His
							580								590
Leu	Lys	Arg	Val	Gln	Leu	Arg	Glu	Leu	Ser	Glu	Ala	Glu	Val	Arg	Gln
							595								605
His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe	Ile
							610								620
Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Ile	Val	Asn	Met	Asp	Tyr	Val	Val
625							630								640
Gly	Ala	Arg	Thr	Phe	Arg	Arg	Glu	Lys	Arg	Ala	Glu	Arg	Leu	Thr	Ser
							645								655

Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg			
660	665	670	
Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg			
675	680	685	
Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro			
690	695	700	
Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile			
705	710	715	720
Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln			
725	730	735	
Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His			
740	745	750	
Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp			
755	760	765	
Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser			
770	775	780	
Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu			
785	790	795	800
Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His			
805	810	815	
Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro			
820	825	830	
Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp			
835	840	845	
Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu			
850	855	860	

Arg	Leu	Val	Asp	Asp	Phe	Leu	Leu	Val	Thr	Pro	His	Leu	Thr	His	Ala
865						870					875				880
Lys	Thr	Phe	Leu	Arg	Thr	Leu	Val	Arg	Gly	Val	Pro	Glu	Tyr	Gly	Cys
						885					890				895
Val	Val	Asn	Leu	Arg	Lys	Thr	Val	Val	Asn	Phe	Pro	Val	Glu	Asp	Glu
						900					905				910 /
Ala	Leu	Gly	Gly	Thr	Ala	Phe	Val	Gln	Met	Pro	Ala	His	Gly	Leu	Phe
						915					920				925
Pro	Trp	Cys	Gly	Leu	Leu	Leu	Asp	Thr	Arg	Thr	Leu	Glu	Val	Gln	Ser
						930					935				940
Asp	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Ala	Arg	Thr	Ser	Ile	Arg	Ala	Ser	Leu	Thr	Phe
945						950					955				960
Asn	Arg	Gly	Phe	Lys	Ala	Gly	Arg	Asn	Met	Arg	Arg	Lys	Leu	Phe	Gly
						965					970				975
Val	Leu	Arg	Leu	Lys	Cys	His	Ser	Leu	Phe	Leu	Asp	Leu	Gln	Val	Asn
						980					985				990
Ser	Leu	Gln	Thr	Val	Cys	Thr	Asn	Ile	Tyr	Lys	Ile	Leu	Leu	Leu	Gln
						995					1000				1005
Ala	Tyr	Arg	Phe	His	Ala	Cys	Val	Leu	Gln	Leu	Pro	Phe	His	Gln	Gln
						1010					1015				1020
Val	Trp	Lys	Asn	Pro	Thr	Phe	Phe	Leu	Arg	Val	Ile	Ser	Asp	Thr	Ala
1025						1030					1035				1040
Ser	Leu	Cys	Tyr	Ser	Ile	Leu	Lys	Ala	Lys	Asn	Ala	Gly	Met	Ser	Leu
						1045					1050				1055
Gly	Ala	Lys	Gly	Ala	Ala	Gly	Pro	Leu	Pro	Ser	Glu	Ala	Val	Gln	Trp
						1060					1065				1070

Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg His Arg Val Thr

1075

1080

1085

Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser

1090

1095

1100

Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn

1105

1110

1115

1120

Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp

1125

1130

<210> 32

<211> 3396

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<223> (1)..(3399)

<400> 32

atg ccg cgc gct ccc cgc tgc cga gcc gtg cgc tcc ctg ctg cgc agc 48

Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser

1

5

10

15

cac tac cgc gag gtg ctg ccg ctg gcc acg ttc gtg cgg cgc ctg ggg 96

His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly

20

25

30

ccc cag ggc tgg cgg ctg gtg cag cgc ggg gac ccg gcg gct ttc cgc 144

Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg

35

40

45

gcg ctg gtg gcc cag tgc ctg gtg tgc gtg ccc tgg gac gca cgg ccg 192

Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro	
50 55 60	
ccc ccc gcc gcc ccc tcc ttc cgc cag gtg tcc tgc ctg aag gag ctg	240
Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu	
65 70 75 80	
gtg gcc cga gtg ctg cag agg ctg tgc gag cgc gcc gcg aag aac gtg	288
Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val	
85 90 95	
ctg gcc ttc gcc ttc gcg ctg ctg gac ggg gcc cgc ggg gcc ccc ccc	336
Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro	
100 105 110	
gag gcc ttc acc acc agc gtg cgc agc tac ctg ccc aac acg gtg acc	384
Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr	
115 120 125	
gac gca ctg cgg ggg agc ggg gcg tgg ggg ctg ctg ctg cgc cgc gtg	432
Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val	
130 135 140	
ggc gac gac gtg ctg gtt cac ctg ctg gca cgc tgc gcg ctc ttt gtg	480
Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val	
145 150 155 160	
ctg gtg gct ccc agc tgc gcc tac cag gtg tgc ggg ccg ccg ctg tac	528
Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr	
165 170 175	
cag ctc gcc gct gcc act cag gcc cgg ccc ccg cca cac gct agt gga	576
Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly	
180 185 190	

ccc cga agg cgt ctg gga tgc gaa cgg gcc tgg aac cat agc gtc agg	624
Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg	
195 200 205	
gag gcc ggg gtc ccc ctg ggc ctg cca gcc ccg ggt gcg agg agg cgc	672
Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg	
210 215 220	/
ggg ggc agt gcc agc cga agt ctg ccg ttg ccc aag agg ccc agg cgt	720
Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg	
225 230 235 240	
ggc gct gcc cct gag ccg gag cgg acg ccc gtt ggg cag ggg tcc tgg	768
Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp	
245 250 255	
gcc cac ccg ggc agg acg cgt gga ccg agt gac cgt ggt ttc tgt gtg	816
Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val	
260 265 270	
gtg tca cct gcc aga ccc gcc gaa gaa gcc acc tct ttg gag ggt gcg	864
Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala	
275 280 285	
ctc tct ggc acg cgc cac tcc cac cca tcc gtg ggc cgc cag cac cac	912
Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His	
290 295 300	
gcg ggc ccc cca tcc aca tgc cgg cca cca cgt ccc tgg gac acg cct	960
Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro	
305 310 315 320	
tgt ccc ccg gtg tac gcc gag acc aag cac ttc ctc tac tcc tca ggc	1008
Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly	

325	330	335	
gac aag gag cag ctg cgg ccc tcc ttc cta ctc agc tct ctg agg ccc			1056
Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro			
340	345	350	
agc ctg act ggc gct cgg agg ctc gtg gag acc atc ttt ctg ggt tcc			1104
Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser			
355	360	365	
agg ccc tgg atg cca ggg act ccc cgc agg ttg ccc cgc ctg ccc cag			1152
Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln			
370	375	380	
cgc tac tgg caa atg cgg ccc ctg ttt ctg gag ctg ctt ggg aac cac			1200
Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His			
385	390	395	400
gcg cag tgc ccc tac ggg gtg ctc ctc aag acg cac tgc ccg ctg cga			1248
Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg			
405	410	415	
gct gcg gtc acc cca gca gcc ggt gtc tgt gcc cgg gag aag ccc cag			1296
Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln			
420	425	430	
ggc tct gtg gcg gcc ccc gag gag gag gac aca gac ccc cgt cgc ctg			1344
Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu			
435	440	445	
gtg cag ctg ctc cgc cag cac agc agc ccc tgg cag gtg tac ggc ttc			1392
Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe			
450	455	460	
gtg cgg gcc tgc ctg cgc cgg ctg gtg ccc cca ggc ctc tgg ggc tcc			1440

cat cgg gaa gcc agg ccc gcc ctg ctg acg tcc aga ctc cgc ttc atc	1872
His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile	
610 615 620	
ccc aag cct gac ggg ctg cgg ccg att gtg aac atg gac tac gtc gtg	1920
Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val	
625 630 635 640	
gga gcc aga acg ttc cgc aga gaa aag agg gcc gag cgt ctc acc tcg	1968
Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser	
645 650 655	
agg gtg aag gca ctg ttc agc gtg ctc aac tac gag cgg gcg cgg cgc	2016
Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg	
660 665 670	
ccc ggc ctc ctg ggc gcc tct gtg ctg ggc ctg gac gat atc cac agg	2064
Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg	
675 680 685	
gcc tgg cgc acc ttc gtg ctg cgt gtg cgg gcc cag gac ccg ccg cct	2112
Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro	
690 695 700	
gag ctg tac ttt gtc aag gtg gat gtg acg ggc gcg tac gac acc atc	2160
Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile	
705 710 715 720	
ccc cag gac agg ctc acg gag gtc atc gcc agc atc atc aaa ccc cag	2208
Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln	
725 730 735	
aac acg tac tgc gtg cgt cgg tat gcc gtg gtc cag aag gcc gcc cat	2256
Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His	

740	745	750	
ggg cac gtc cgc aag gcc ttc aag agc cac gtc tct acc ttg aca gac			2304
Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp			
755	760	765	
ctc cag ccg tac atg cga cag ttc gtg gct cac ctg cag gag acc agc			2352
Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser			
770	775	780	
ccg ctg agg gat gcc gtc gtc atc gag cag agc tcc tcc ctg aat gag			2400
Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu			
785	790	795	800
gcc agc agt ggc ctc ttc gac gtc ttc cta cgc ttc atg tgc cac cac			2448
Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His			
805	810	815	
gcc gtg cgc atc agg ggc aag tcc tac gtc cag tgc cag ggg atc ccg			2496
Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro			
820	825	830	
cag ggc tcc atc ctc tcc acg ctg ctc tgc agc ctg tgc tac ggc gac			2544
Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp			
835	840	845	
atg gag aac aag ctg ttt gcg ggg att cgg cgg gac ggg ctg ctc ctg			2592
Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu			
850	855	860	
cgt ttg gtg gat gat ttc ttg ttg gtg aca cct cac ctc acc cac gcg			2640
Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala			
865	870	875	880
aaa acc ttc ctc agg acc ctg gtc cga ggt gtc cct gag tat ggc tgc			2688

Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys	
885 890 895	
gtg gtg aac ttg cgg aag aca gtg gtg aac ttc cct gta gaa gac gag	2736
Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu	
900 905 910	
gcc ctg ggt ggc acg gct ttt gtt cag atg ccg gcc cac ggc cta ttc	2784
Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe	
915 920 925	
ccc tgg tgc ggc ctg ctg ctg gat acc cgg acc ctg gag gtg cag agc	2832
Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser	
930 935 940	
gac tac tcc agc tat gcc cgg acc tcc atc aga gcc agt ctc acc ttc	2880
Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe	
945 950 955 960	
aac cgc ggc ttc aag gct ggg agg aac atg cgt cgc aaa ctc ttt ggg	2928
Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly	
965 970 975	
gtc ttg cgg ctg aag tgt cac agc ctg ttt ctg gat ttg cag gtg aac	2976
Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn	
980 985 990	
agc ctc cag acg gtg tgc acc aac atc tac aag atc ctc ctg ctg cag	3024
Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln	
995 1000 1005	
gcg tac agg ttt cac gca tgt gtg ctg cag ctc cca ttt cat cag caa	3072
Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln Gln	
1010 1015 1020	

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer
sequence

<400> 33

ttggcttcca ggccataatt g 21

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer
sequence

<400> 34

aagagggcag atctatcgga 20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer
sequence

<400> 35

atggatctcc tgaaggtgct 20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer
sequence

<400> 36

aagagggcag atctatcgga

20

<210> 37

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer
sequence

<400> 37

ggaagagtga gcggccatca agg

23

<210> 38

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer
sequence

<400> 38

ctgctggaga ggttattcct cg

22

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer
sequence

<400> 39

gccaacaccā acctgtccaa gttc

24

<210> 40

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer
sequence

<400> 40

tgcaaaggct ccaggctctga gggc

24

<210> 41

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer
sequence

<400> 41

ctctctctcc tcaggacaa

19

<210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer
sequence

<400> 42

tggagcaaaa cagaatggct gg 22

<210> 43

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer
sequence

<400> 43

ctgagatgtc tctctctctc ttag 24

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer
sequence

<400> 44

acaatgactg atgagagatg 20

<210> 45

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer
sequence

<400> 45

cagacctgaa ggagacct

18

<210> 46

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer
sequence

<400> 46

gtcagcgtaa acagttgc

18

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer
sequence

<400> 47

gcccaagaagc ggatagaagg

20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer
sequence

<400> 48

ctgtggttca gggctcagtc

20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer
sequence

<400> 49

cagtggagct ggacaaagcc

20

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer
sequence

<400> 50

tagcgacggt tctggaacca

20

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer
sequence

<400> 51

ctgtcatctc actatgggca

20

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer
sequence

<400> 52

ccaagtccga gcaggaattt

20

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer
sequence

<400> 53

aagacgtcaa gccctttgtg

20

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer
sequence

<400> 54

aaaggagcac acttttgttg

20

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer
sequence

<400> 55

agcaagaata cgatgccatc

20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>Description of Artificial Sequence: artificially

synthesized primer sequence

<400> 56

gaaggggtgg tggtagcgtc

20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 57

tgggaatggc tatgtcagt

20

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 58

ctggtaatct gtgtttagg

20

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer
sequence

<400> 59

caagggcctc tccaaacttg

20

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer
sequence

<400> 60

gccccagaga cagcattcca

20